

UNIVERSIDAD DE PANAMÁ



VICERRECTORÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO

PROGRAMA DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES EXACTAS Y TECNOLOGÍA

DISTRIBUCIÓN DE LAS FRECUENCIAS DE LOS GENES Y HAPLOTIPOS QUE
CODIFICAN PARA RECEPTORES TIPO INMUNOGLOBULINAS DE LAS
CÉLULAS ASESINAS (KIR)

JUAN CARLOS MOSCOSO MORCILLO

6-86-631

COMO REQUISITO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE MAESTRÍA EN CIENCIAS
BIOLÓGICAS OPCIÓN GENÉTICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR

JUNIO 2016



Titulo de la Tesis:

"Distribución de las Frecuencias de los Genes y Haplotipos que Codifican para Receptores tipo Inmoglobulinas de las Células Asesinas Naturales (KIR)"

TESIS

Sometida para optar al título de Maestría en Ciencias Biológicas,
Opción Genética y Biología Molecular

Vicerrectoría de Investigación y Postgrado
Facultad de Ciencias Naturales, Exactas y Tecnología

APROBADO POR:

Doctor Carlos Ramos
Presidente

Doctora Edna Amada González
Miembro

Mgtr. Olga Chen
Miembro

REFRENDADO POR:

**REPRESENTANTE DE LA VICERRECTORÍA
DE INVESTIGACIÓN Y POSTGRADO**

FECHA:

18 de agosto de 2016

10 OCT 2016

V. Vergara

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, darle gracias a Dios por permitirme llegar hasta esta etapa y poder finalizarla satisfactoriamente

A mis padres Higinio Moscoso y Noris Morcillo de Moscoso A mis hermanos Rodrigo Alberto y Luis Carlos por brindarme su apoyo incondicional

Al profesor Alejandro Vernaza Kwiers por sus consejos, por sus conocimientos compartidos y su interés a que culminara esta meta profesional A mis compañeros de trabajo por el apoyo brindado

Al Dr Carlos Ramos por su valiosa asesoría, sus revisiones y opiniones brindadas para la culminación de mi tesis y a los profesores de la maestría por todas sus enseñanzas durante el periodo de estudio

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
OBJETIVOS	5
FUNDAMENTACIÓN TEORICA	6
1 Células NK (Natural Killer)	6
1 1 Receptores de las células NK	7
1 1 1 Receptor Lectina tipo C	7
1 1 1 1 Receptor CD94 / NKG2	8
1 1 2 Receptor de Superfamilia de Inmunoglobulinas	8
1 1.2 1 KIR	8
2 Localización Cromosómica de los Genes KIR	11
3 Organización de los Genes KIR	12
4 Haplotipos KIR	14
4 1 Predicción de Haplotipos provenientes de Genotipos	15
5 Nomenclatura de los genes KIR	16
6 Métodos para la detección de los genes KIR	17
7 Interacción KIR / ligandos HLA	17
8 Genotipos KIR y Enfermedad	20
9 KIR y Evolución	22

10 Mecanismos de Regulación de la Expresión de los Receptores KIR	23
11 Variabilidad alélica de los KIR	24
12 Generación de la Diversidad de Haplotipos KIR	25
13 Tecnología Luminex	25
METODOLOGÍA	27
1 TIPO DE ESTUDIO	27
2 UNIVERSO	27
3 MUESTRAS	27
4 MÉTODOS	27
4 1 Extracción de Ácidos Nucleicos (ADN)	27
4 2 Medición de la Concentración de ADN	28
4 3 Control de Calidad	29
4 4 Amplificación de los genes KIR	29
4 5 Hibridación de los productos de PCR amplificados	30
4 6 Análisis Estadístico	31
RESULTADOS	32
DISCUSIÓN	39
CONCLUSIONES	46
CITAS BIBLIOGRÁFICAS	47

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro I.	INTERACCIÓN KIR / LIGANDOS HLA.	19
Cuadro II.	PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN EN EL TERMOCICLADOR.	30
Cuadro III.	FRECUENCIA DE GENES KIR ACTIVADORES E INHIBIDORES EN DONANTES DE CÉLULAS PROGÉNITORAS HEMATOPOYÉTICAS.	35
Cuadro IV.	FRECUENCIA DE GENOTIPOS KIR.	36
Cuadro V.	FRECUENCIA DE GENOTIPOS Y PROPORCIÓN DE HAPLOTIPOS KIR.	37
Cuadro VI.	FRECUENCIA DE GENES KIR EN PORCENTAJE (%) EN PANAMÁ COMPARADA CON FRECUENCIAS REPORTADAS EN OTRAS POBLACIONES.	38

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. RECEPTORES KIR	10
FIGURA 2. EL COMPLEJO DE RECEPTORES DE LEUCOCITO (LRC)	10
FIGURA 3. ORGANIZACIÓN DE GENES KIR	14
FIGURA 4. NOMENCLATURA DE LOS GENES Y ALELOS KIR	17
FIGURA 5. LOS RECEPTORES TIPO INMUNOGLOBULINA DE LAS CÉLULAS NK (KIR) Y EL RECEPTOR DE CÉLULAS T $\alpha\beta$ (TCR).	20
FIGURA 6. COMPARACIÓN DEL LOCUS KIR HUMANO CON OTRAS ESPECIES PRIMATES Y NO PRIMATES.	23
FIGURA 7. ASIGNACIÓN DE SONDAS POSITIVAS POR EL LUMINEX	33
FIGURA 8. TIPIFICACIÓN DE GENES KIR EN EL DONANTE	34

ABREVIATURAS

- | | | |
|----|---------|---|
| 1 | ADN | Ácido desoxirribonucleico |
| 2 | CPH | Células Progenitoras Hematopoyéticas |
| 3 | GVHD | por sus siglas en inglés Enfermedad Injerto Contra Huesped |
| 4 | GVL | por sus siglas en inglés Injerto contra Leucemia |
| 5 | HLA | por sus siglas en inglés Antígenos de Leucocitos Humanos |
| 6 | Ig- SF | por sus siglas en inglés Super Familia de Inmunoglobulinas |
| 7 | KIR | por sus siglas en inglés Receptores tipo Inmunoglobulinas de las células NK |
| 8 | LILR | por sus siglas en inglés Receptor Tipo Inmunoglobulina de Leucocito |
| 9 | LRC | por sus siglas en inglés Complejo de Receptores de Leucocito |
| 10 | MHC | por sus siglas en inglés Complejo Mayor de Histocompatibilidad |
| 11 | NCR1 | por sus siglas en inglés Receptor activador de citotoxicidad Natural I |
| 12 | NK | por sus siglas en inglés células Asesinas Naturales |
| 13 | PCR | por sus siglas en inglés Reacción en Cadena de la Polimerasa |
| 14 | SA – PE | por sus siglas en inglés Estreptavidina- Ficoeritrina |
| 15 | SIGLEC | por sus siglas en inglés Lectina Tipo Inmunoglobulina Unidas al Ácido Sialico |
| 16 | SSO | por sus siglas en inglés Oligonucleótidos de Secuencia Específica. |

RESUMEN

Los receptores tipo inmunoglobulinas de las células asesinas (KIR) son codificados por una familia de genes localizada dentro del complejo de receptores de leucocitos en el cromosoma 19q13.4. Su diversidad genómica es alcanzada a través de diferencias en el contenido de genes y polimorfismo alélico. El objetivo de este estudio fue determinar la distribución de genes y haplotipos KIR en donantes de células progenitoras hematopoyéticas (CPH) en Panamá. La genotipificación de 116 muestras de ADN fueron estudiadas por el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa de Oligonucleótidos de Secuencia específica (PCR-SSO) utilizando la tecnología Luminex LIFECODES KIR-SSO. La frecuencia de genes fue calculada para los 16 loci KIR. La frecuencia de cada gen individual fue 100% para KIR3DL3, 3DP1, 2DL4, 3DL2, KIR2DL1 (98.3%), 2DL2 (49.1%), 2DL3 (86.2%), 3DL1 (91.4%), 2DL5 (62.1%), 2DS1 (44%), 2DS2 (47.4%), 2DS3 (25%), 2DS4 (91.4%), 2DS5 (45.7%), 3DS1 (41.4%), 2DP1 (98.3%). De acuerdo a su frecuencia 30 genotipos fueron AA (25.9%), 53 presentaron genotipo AB (45.7%) y 33 presentaron genotipo BB (28.4%). Dentro del genotipo AB, el genotipo más frecuente identificado (18) estaba constituido por KIR3DL3, 2DL3, 2DL5, 2DS5, 2DP1, 2DL1, 3DP1, 2DL4, 3DL1, 3DS1, 2DS1, 2DS4, 3DL2, el cual representa el 15.5% del total de donantes estudiados. En el genotipo BB, el más frecuente genotipo identificado (7) estaba constituido por los genes KIR3DL3, 2DS2, 2DL2, 2DL5, 2DS3, 2DP1, 2DL1, 3DP1, 2DL4, 3DL1, 2DS4, 3DL2, el cual representa el 6% del total de donantes estudiados. Estas frecuencias de genes fueron comparadas con otras poblaciones. Nuestro estudio demostró la diversidad de genes y haplotipos en nuestra población de donantes de Células Progenitoras Hematopoyéticas. Esta base de datos será de utilidad en el estudio de asociación con otras enfermedades y en la selección de donantes haplo idénticos en trasplante de células progenitoras hematopoyéticas.

ABSTRACT

Killer cell immunoglobulin-like receptors (KIR) are encoded by a family of genes located within the leukocyte receptor complex on chromosome 19q13.4. Its genomic diversity is achieved through differences in gene content and allelic polymorphism. The aim of this study was to determine the distribution of KIR genes and haplotypes in donor hematopoietic progenitor cells (HPC) in Panama. Genotyping of 116 DNA samples were studied by the method of Polymerase chain reaction of sequence specific oligonucleotides (PCR-SSO) using the Luminex LIFECODES KIR-SSO technology. The gene frequency was calculated for the 16 loci KIR, the frequency of each gene was 100% for KIR3DL3, 3DP1, 2DL4, 3DL2. KIR2DL1 (98.3%), 2DL2 (49.1%), 2DL3 (86.2%), 3DL1 (91.4%), 2DL5 (62.1%), 2DS1 (44%), 2DS2 (47.4%), 2DS3 (25%), 2DS4 (91.4%), 2DS5 (45.7%), 3DS1 (41.4%), 2DP1 (98.3%). According to their frequency 30 donors were AA haplotype (25.9%), 53 had haplotypes AB (45.7%) and 33 had haplotypes BB (28.4%). Within the haplotype AB, the most frequent genotype identified (18) consisted of the following genes KIR(KIR3DL3, 2DL3, 2DL5, 2DS5, 2DP1, 2DL1, 3DP1, 2DL4, 3DL1, 3DS1, 2DS1, 2DS4, 3DL2) which represents 15.5% of donors studied. In the haplotype BB, the most frequent genotype identified (7) consisted of the following genes KIR (KIR3DL3, 2DS2, 2DL2, 2DL5, 2DS3, 2DP1, 2DL1, 3DP1, 2DL4, 3DL1, 2DS4, 3DL2) which represents 6% of donors studied. These gene frequencies were compared with other populations. Our study demonstrated the diversity of genes and haplotypes in our population. This database will be useful in the study of association with other diseases and selection of haploidentical donor hematopoietic progenitor cells.

INTRODUCCIÓN

El Trasplante de Células Progenitoras Hematopoyéticas (TCPH) es una terapia valiosa para leucemias agudas refractarias, leucemias con alto riesgo de recaída, síndromes mielodisplásicos y Leucemias Mieloides Crónicas. El éxito del Trasplante depende de varios factores, incluyendo el estadio de la enfermedad, el grado de compatibilidad de los Antígenos de Leucocitos Humanos (HLA) entre el donante y el receptor, el régimen de acondicionamiento y el desarrollo de la enfermedad injerto contra huésped (GVHD). Estudios recientes indican que otro factor potencial que influye en el éxito del trasplante es la presencia de células asesinas Naturales (NK), provenientes del donante (Caligiuri, 2008). Las células NK, participan en la respuesta inmune innata contra células infectadas por virus y células malignas transformadas en forma temprana. Además son las primeras subpoblaciones de linfocitos que reconstituyen la sangre periférica después del trasplante y han sido implicadas en la supresión GVHD, la promoción del injerto y participan en el efecto injerto contra Leucemia (GVL). Las células NK son reguladas por diferencias cuantitativas de señales activadoras e inhibidoras a través de moléculas de superficie KIR (Receptores tipo inmunoglobulinas de las Células NK) en los cuales sus principales ligandos son las moléculas HLA clase I. La ausencia en el receptor de Trasplante de ligandos HLA para los receptores KIR inhibidores en las células NK del donante puede llevar a una disminución del umbral de activación y permitir un efecto antileucémico. Adicionalmente la presencia de receptores KIR activadores facilitaría este evento. En

Panamá no hay datos de los genes KIR que están circulando en nuestro medio que puedan contribuir a la selección de un mejor donante de células progenitoras hematopoyéticas y al mismo tiempo determinar la presencia de genes que puedan brindar protección

OBJETIVOS GENERALES

Determinar los genes y haplotipos de los receptores tipo inmunoglobulina de las células NK (KIR) presentes en donantes de células Progenitoras Hematopoyéticas (CPH)

Objetivos específicos

- 1 Identificar cuantos tipos de genes KIR están presentes en donantes de CPH**
- 2 Determinar la frecuencia de genes KIR inhibidores y activadores en donantes de CPH**
- 3 Determinar la frecuencia de los genotipos AA, AB y BB en donantes de CPH**

FUNDAMENTACION TEORICA

Células NK (Natural Killer)

Las células NK representan del 10 al 15 % de los leucocitos circulantes en sangre periférica y su función principal está en la inmunidad innata (Ljunggren *et al* , 1990) Estas células tienen la capacidad de matar ciertas células infectadas por ciertos virus y tumores, sin ser necesario su estimulación previa de estas células NK Las células NK llenan la ventana entre el inicio de la enfermedad y la respuesta inmune celular y humoral específica (Bancroft, 1993, Trinchieri, 1989) La disminución en la expresión de antígenos HLA en células infectadas por virus, las hace resistente a la lisis de los linfocitos T citotóxicos (CD8+) Pero estos niveles aberrantes de HLA las predispone a la lisis por las células NK y así como las células T, las células NK representan armas complementarias de la respuesta inmune celular

Las células NK se derivan de un progenitor linfoide, poseen un gran citoplasma con gránulos y núcleo excéntrico en forma de frijol Los estadios de desarrollo son completados en la médula ósea bajo influencia de factores estimulantes de células estromales (SC) proporcionando señales de crecimiento para las células NK (Colucci *et al* 2003) Entre los factores importantes para el desarrollo de las células NK se incluye, Interferon- γ (IFN- γ), el cual es producido por las células estromales en presencia de interleuquina-2 (IL-2) (Scalzo, 2002) La interleuquina-15 (IL-15), producida por las

células dendríticas, es importante para el desarrollo de las células NK y para la homeostasis de las células NK maduras y su supervivencia (Piccioli *et al* , 2002, Jamieson *et al* , 2004)

Las células NK viajan a través del cuerpo, una vez son liberadas de la médula ósea, en un estado de actividad parcial, usando esto como estrategia de tolerancia a lo propio (Pobezinski *et al* , 2004) En el sitio de infección, las células NK son transportadas a través de vasos sanguíneos mediante un proceso conocido como “diapedesis” (Kitayama *et al* , 1993) Los receptores de superficie sobre las células NK interactúan con quimioquinas liberadas de neutrófilos y macrófagos atrayendo a las células NK al sitio de infección (Loetscher *et al* , 1996)

Receptores de las Células NK

Células NK expresan un rango de receptores, los cuales participan en su función y regulación. Estas células poseen dos tipos principales de receptores específicos para molécula HLA clase I. El receptor de lectina tipo C y los receptores de la super familia de Inmunoglobulina (Ig- SF)

a. Receptor lectina tipo C

Este receptor está involucrado en la regulación de la respuesta inmune y adaptativa, a través de la liberación de quimioquinas y citoquinas (Biron *et al* , 1999) Esta familia de receptores de lectina tipo-C incluye al heterodímero CD94/NKG2 y está localizado centroméricamente en el complejo de las células asesinas naturales (Natural Killer complex, por sus siglas en inglés NKC), ubicado en el cromosoma 12 (Barten *et al* , 2001)

a.1. Receptor CD94/NKG2. Este receptor está localizado en el cromosoma 12 y es parte del complejo Natural Killer (NKC) y se compone de un gen CD94 no polimórfico y de los genes NKG2 (1-5) Este heterodímero CD94/NKG2 está presente en roedores, primates y en humanos Este receptor interactúa con moléculas MHC clase I no clásicas, tales como HLA-E La molécula HLA-E posee un papel muy específico en el reconocimiento de las células NK HLA-E se une al péptido señal de las moléculas clásica HLA clase I, tales como, HLA-A, -B, -C y -G La expresión de HLA-E sobre la superficie celular no es estable a menos que se encuentre unida al péptido señal Una vez el receptor CD94NKG2 reconoce a HLA-E es dependiente de la producción de otra molécula HLA clase I Esto es un método indirecto de supervivencia y está disponible para el monitoreo de la expresión promedio de los niveles de la molécula MHC clase I (Braud *et al* , 1998)

b. Receptor de superfamilia de las inmunoglobulinas

El receptor de la super familia de las Inmunoglobulinas está involucrado en la muerte de todos los virus y de las células tumorales (Biron *et al* , 1999) Estos receptores específicos de HLA están localizados en el cromosoma 19 como parte del Complejo de Receptores de Leucocitos (LRC) (Vilches & Parham, 2002)

b.1. KIR

Los KIR son moléculas polimórficas de la superficie celular que están presentes sobre células NK y una pequeña población (8%) de células conocidas como células T Asesinas Naturales (NKT) Estos receptores reconocen moléculas HLA Clase I y al hacer esto proporcionan un medio alternativo de modulación de la respuesta inmune a una célula extraña o modificada (Shilling *et al* , 2002) Las proteínas KIR presentan características

de dominios tipo Inmunoglobulinas en su región extracelular, la cual está involucrada en la unión a ligandos HLA – Clase I, al igual que presentan una región transmembrana y una región citoplasmática la cual define el tipo de señal traducida a la célula NK. Estos receptores controlan la respuesta de las células NK humanas en respuesta a señales inhibitorias o activadoras a partir del reconocimiento de moléculas ligandos HLA Clase I sobre la superficie de la célula blanco potencial (Vilches *et al* , 2000). Los receptores KIR pueden presentar colas citoplasmáticas cortas (-S Short) o colas citoplasmáticas Largas (-L Long). Las colas citoplasmáticas -L, generalmente presentan Motivos Inhibitorios basados en Inmune Tirosina (ITIMS), los cuales traducen señales inhibitorias a las células NK. Las colas citoplasmáticas cortas -S, presentan residuos de aminoácidos cargados positivamente (Lisina) en su región transmembrana, la cual permite la asociación con la proteína adaptadora DAP12 capaz de generar una señal de activación (Vilches & Parham, 2002).

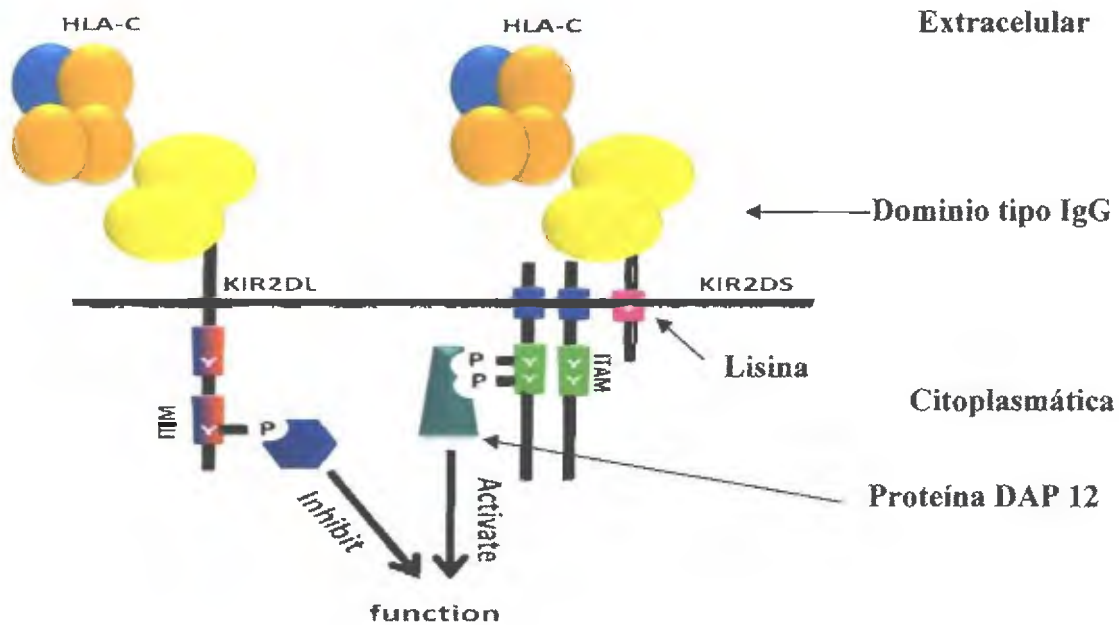


Fig. 1. Receptores KIR. Los receptores KIR presentan en la superficie dominios tipo Inmunoglobulinas que interaccionan con moléculas HLA- clase I. Los receptores que presentan una cola citoplasmática larga contienen Motivos Inhibitorios basados en Inmune Tirosina (ITIMS), los cuales traducen señales que inhiben a las células NK. Los receptores con colas citoplasmáticas cortas presentan residuos de aminoácidos cargados positivamente (Lisina) en su región transmembrana, la cual permite la asociación con la proteína adaptadora DAP12 capaz de generar una señal de activación (Vilches & Parham, 2002).

Localización Cromosómica de los Genes KIR

La familia de los genes KIR en el humano está localizado en el cromosoma 19q13.4 dentro del Complejo de Receptores de Leucocitos (LRC) en una región aproximada de 150 kb (Wilson *et al.*, 2000; Trowsdale, 2001). En el complejo KIR hay 16 loci que incluyen 14 genes (KIR3DS1, KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR2DS1, KIR2DS2, KIR2DS3, KIR2DS4, KIR2DS5, KIR2DL1, KIR2DL2, KIR2DL3, KIR2DL4, KIR2DL5) y dos pseudogenes (KIR3DP1 y KIR2DP1) (Martin *et al.*, 2000).

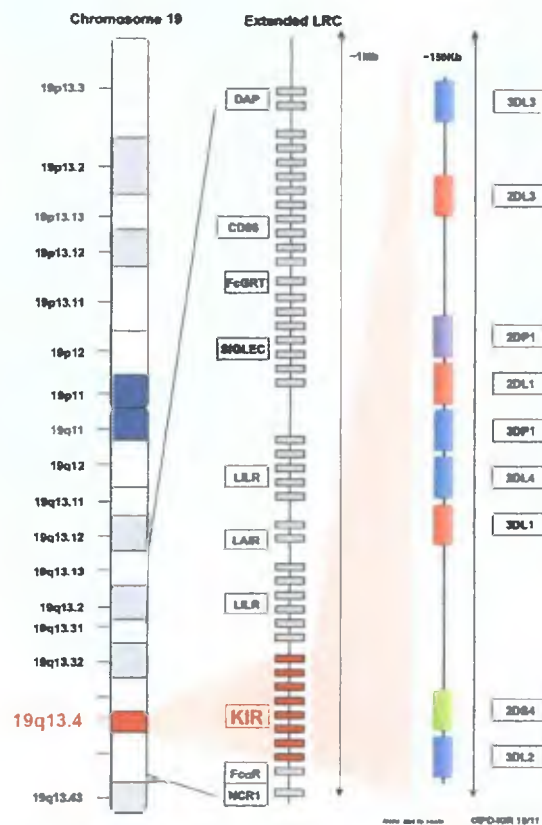


Fig. 2. Complejo de receptores de Leucocito (LRC) (19q13.4). Ejemplo de un haplotipo A KIR, los genes KIR están localizados en una región de 150 Kb de los 1Mb de longitud del LRC en el cromosoma 19. El LRC contiene también los genes que codifican para proteínas adaptadoras DAP, Antígeno CD66 , así como los receptores SIGLEC, FcGRT, LILR, LAIR, FcAlfa R y receptores NCR1.

Organización de los genes KIR

Los genes KIR dentro del LRC se encuentran localizados uno al lado del otro y constan de 9 exones. Los exones 1 y 2 codifican para el péptido señal, los exones 3, 4 y 5 codifican dominios extracelulares (D0, D1 y D2) tipo Inmunoglobulina, los exones 6 y 7 codifican el tallo y la región transmembrana y los exones 8 y 9 codifican para la cola citoplasmática (Carrington & Norman, 2003). Los genes KIR son clasificados de acuerdo a su característica estructural en alguno de los 3 tipos

Genes KIR2D Tipo I Codifican proteínas con dos dominios extracelulares con una conformación D1 - D2. Incluyen a los genes KIR2DL1-3 y KIR2DS1-5 al igual que el pseudogen KIR2DP1 (Colonna & Samaridis, 1985). En estos genes el exón 3 es realmente un pseudoexón y es eliminado durante el procesamiento y maduración del transcrito primario. Por lo tanto, el receptor codificado por este tipo de genes no presentará el dominio D0 (Vilches *et al*, 2000a). Los genes KIR2DL1 y KIR 2DL2 comparten una delección en el exón 7, distinguiéndolos del resto de los otros KIR con una secuencia más corta del exón 7. KIR2DL1-3 difiere de los KIR2DS1-5 solamente en la longitud del exón 9 que codifica para la cola citoplasmática. El pseudogen KIR2DP1 presenta un codón de parada en el exón 4 (Vilches *et al*, 2000b).

Genes KIR2D Tipo II Codifican proteínas con dominios extracelulares con una conformación D0 - D2. Incluye los genes KIR2DL4 y KIR2DL5. Los genes pertenecientes a este Tipo II presentan del exón 4, por lo cual van a carecer del dominio D1 (Vilches *et al*, 2000b).

KIR2DL4 presenta diferencia con el gen KIR2DL5 (así como con los otros genes KIR) por la longitud en la secuencia del exón 1, el cual es de 6 nucleótidos más largo. KIR2DL5 puede ocupar 2 loci distintos dentro del complejo KIR, uno en la región centromérica y el otro en la telomérica debido a una duplicación. Para diferenciarlos se añade una letra al final del nombre KIR2DL5A y KIR2DL5B, telomérico y centromérico, respectivamente (Gomez-Lozano *et al* , 2002)

Genes KIR3D Codifican proteínas con tres dominios extracelulares con una conformación D0 – D1 – D3 (Vilches & Parham, 2002). Pertenecen a este tipo los genes KIR3DL1, KIR3DL2, KIR3DL3, KIR3DS1, el pseudogen KIR3DP1 y a KIR3DX1. Estos genes presentan la estructura de 9 exones, con excepción de KIR 3DL3, que carece del exón 6 (Tokar *et al* , 1998) y de KIR 3DP1 en el que están presentes solo los 5 primeros exones y un exón 6 distinto al descrito en el resto de los genes KIR (Gómez – Lozano *et al* , 2001)

KIR3DX1 es un gen KIR ancestral detectado en primates y en la especie *Bos taurus*. Este gen tiene una delección de 7 pb en el exón 5 el cual genera un codón de parada prematuro (Guethlein *et al* , 2007). Hasta el momento no hay datos acerca de su expresión. Es considerado como pseudogén.

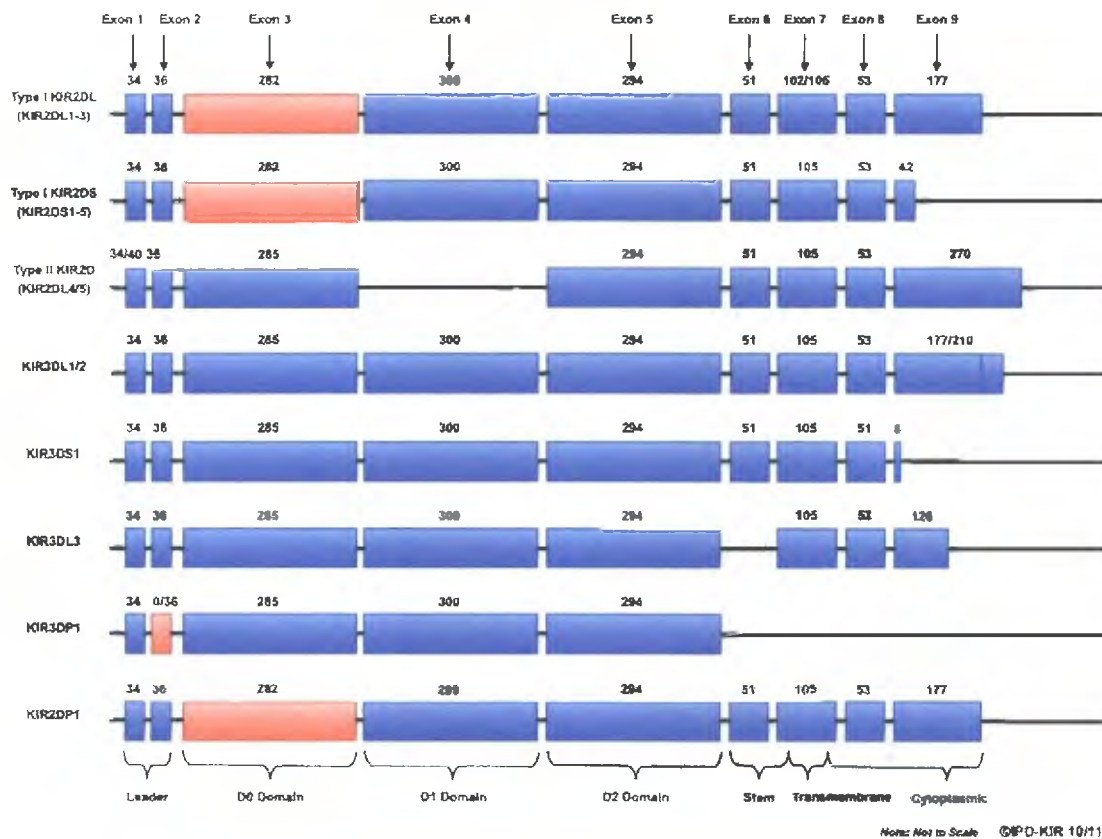


Fig. 3. Organización de genes KIR. Los genes KIR que comparten organización estructural similar se han agrupados en Tipo I, II. Los genes KIR con particularidades estructurales se muestran por sí mismos. Los exones se representan como cajas azules y su tamaño en pares de bases se muestra encima de estos. El pseudoexon 3 y la delección en el exón del KIR3DP1 se muestran en rojo. En la parte inferior de la figura se muestran las regiones del gen que codifican para los dominios y regiones de la proteína.

Haplotipos KIR

Sobre la base del contenido de genes, los haplotipos KIR son ampliamente clasificados dentro de dos grupos (Uhrberg *et al.*, 1997). Haplotipos de grupo A tiene un contenido de genes fijos que comprenden KIR3DL3-2DL3-2DP1-2DL1-3DP1-2DL4-3DL1-2DS4- 3DL2 los cuales codifican predominantemente genes inhibidores (Wilson *et al.*, 2000), pero son diversificados a través del polimorfismo alélico de los genes

individuales. En contraste los haplotipos de grupo B presentan variación en el contenido de genes y alelos que no forman parte del Haplotipo de grupo A. Particularmente, KIR2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS5, 2DL2, 2DL5 y 3DS1 son asociados solamente con haplotipos de grupo B y estos haplotipos generalmente codifican más receptores KIR activadores que el Haplotipo A el cual solamente codifica para un solo receptor activador, KIR2DS4. Técnicas de genotipificación KIR utilizadas en análisis de segregación de familia han definido más de 40 haplotipos de grupo B (Uhrberg *et al* , 2002, Kahkoo & Carrington , 2006).

Cuatro genes marco (KIR3DL3, 3DP1, 2DL4 y 3DL2) están conservados en ambos haplotipos A y B y además presentes en todos los individuos humanos.

Predicción de Haplotipos provenientes de Genotipos

El contenido de genes KIR en un individuo particular es convencionalmente llamado como “Genotipo KIR”, el cual es variable entre individuos. El contenido de genes KIR es utilizado para inferir los Haplotipos de grupo A y grupo B y poder asignar uno de los tres Genotipos AA, BB y AB. Los individuos que solamente poseen genes pertenecientes al Haplotipo de grupo A (KIR3DL3- 2DL3-2DL1-2DP1-3DP1-2DL4-3DL1-2DS4-3DL2) son considerados por ser homocigóticos para el Haplotipo A y son asignados como genotipo AA. Los individuos que les falte alguno de los cuatro genes asociados al Haplotipo A (KIR2DL1, 2DL3, 3DL1 y 2DS4) son asignados como Genotipo BB. Todos los otros individuos son considerados heterocigotos para el Haplotipo A y B son considerados como Genotipo AB. Los individuos del Genotipo AB presentan todos los nueve genes presentes en el Haplotipo A, así como uno o más genes específicos del

Haplotipo B (2DL2, 2DL5, 2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS5 y 3DS1) El Genotipo AB y BB (1 o 2 haplotipos B) pueden ser asignados como Bx (McQueen *et al* , 2007)

Nomenclatura de los genes KIR

Los primeros KIR en ser definidos fueron receptores inhibitorios por lo cual inicialmente se utilizó el acrónimo receptores inhibitorios de las células asesinas (del inglés Killer- cell Inhibitory Receptor) Cuando se observó que esta familia de moléculas incluían tanto receptores inhibidores como activadores, el acrónimo KIR fue retenido y ahora es aceptado como una abreviación de Receptores tipo Inmunoglobulina de las células asesinas (del inglés Killer- cell immunoglobulin- like receptor) (Long *et al* , 1996)

El nombre dado a los genes KIR está basado en la estructura de las moléculas que codifican El primer dígito seguidamente del acrónimo KIR corresponde al número de dominios tipo Ig en la molécula y la “D” denota dominio Seguidamente a la letra D por alguna “L” la cual indica una cola citoplasmática larga “Long”, una “S” indica una cola citoplasmática corta “Short” o una “P” para denominar un pseudogen El dígito final indica el número de genes que codifican una proteína con esta estructura Entonces KIR2DL1, KIR2DL2 y KIR2DL3, todos codifican receptores que tienen dos dominios extracelulares tipo Ig y con cola citoplasmática Larga (Vilches & Parham 2002)

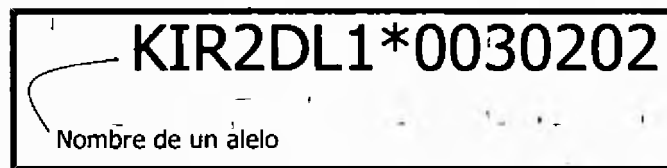


Fig. 4. Nomenclatura de los genes y alelos KIR. Las letras **KIR** son un acrónimo, **2D** 2 dominios tipo IgG, **L** Cola citoplasmática Larga **1** primera proteína **2DL** descrita *****: separador, **003** miembro de la tercera serie de proteínas KIR2DL2, **02** difiere de otras proteínas KIR2DL1*003 por una sustitución sinónima dentro de la región codificante, **02** difiere de otros alelos KIR2DL1*00302 por una sustitución de DNA dentro de una región no codificante

Métodos para detección de genes KIR

Históricamente los laboratorios con interés en la tipificación de presencia o ausencia de genes KIR han utilizado métodos como la secuencia específica de cebadores (SSP) (Uhrberg *et al* , 1997, Vilches *et al* , 2007, Gomez – Lozano *et al* , 2002, Norman *et al* , 2004) y sondas de oligonucleótidos de secuencia específica (SSOP) (Middleton *et al* , 2005) Sin embargo, estos métodos no son adecuados para determinar el número de copias presentes del gen Como resultado de esto algunos laboratorios han utilizado la secuenciación para la definición de alelos y otros han utilizado la espectrometría de masa o la reacción en cadena de la polimerasa transcripción reversa en tiempo real, la cual no solo puede proveer utilidad para la determinación de alelos, sino que también el numero de copias de cada gen o alelo (Cooley *et al* , 2009, Norman *et al.*, 2007, Du *et al.*, 2008)

INTERACCIÓN KIR / LIGANDOS HLA

Los ligandos de los receptores KIR son moléculas HLA-Clase I las cuales están presentes en todas las células nucleadas y cuyos genes están localizados en el brazo corto del cromosoma 6 (Marsh *et al* , 2000)

Los alelos del locus HLA- C pueden ser agrupados en dos tipos de ligandos (grupo C1 y grupo C2) Los receptores KIR2DL1 y KIR2DS1 reconocen específicamente al grupo C2 Mientras KIR2DL2, KIR2DL3 y KIR2DS2 interactúan específicamente al grupo C1 HLA –C del grupo 1 y HLA- C del grupo 2 presentan un dimorfismo en la posición 80 en la hélice α 1 de la molécula HLA – C HLA – C del grupo C1 se caracteriza por presentar el aminoácido serina en la posición 77 y asparagina en la posición 80 (Ser77/Asn80) El ligando HLA- C del grupo C2 presenta asparagina en la posición 77 y lisina en la posición 80 (Asn77/Lys80) (Carrington & Norman, 2003) KIR3DL1 interactúa con especificidad HLA del grupo Bw4, el cual difiere de la especificidad BW6 por el polimorfismo 77 y 80 (Petersdorf, 2007) KIR3DL2 interactúa con HLA- A3 y HLA- A11 KIR2DL4 reconoce HLA- G, una molécula HLA- clase I de poco polimorfismo KIR2DS4 interactúa con HLA-Cw4 Los receptores KIR2DL5, KIR2DS3, KIR2DS5 y KIR3DL3 no se conocen sus ligandos (Carrington & Norman, 2003)

CUADRO I

INTERACCIÓN KIR / LIGANDOS HLA

KIR2DL1 y KIR2DS1	KIR2DL2/3 KIR2DS2	KIR3DL1/S1	KIR3DL2	KIR2DL4	KIR2DS4
Asn77/ Lys80	Ser77 / Asn80				
HLA – C (C2)	HLA – C (C1)	HLA-B Bw4	HLA – A	HLA – G	
C* 02	C*01	B*08	A*03		C* 04
C* 04	C*03	B*13	A*11		
C*05	C*07	B*27			
C*06	C*08	B*44			
C*17	C*13	B*51			
C*18	C*14	B*52			
		B*53			
		B*57			
		B*58			

Interacción de genes KIR con sus ligandos de HLA

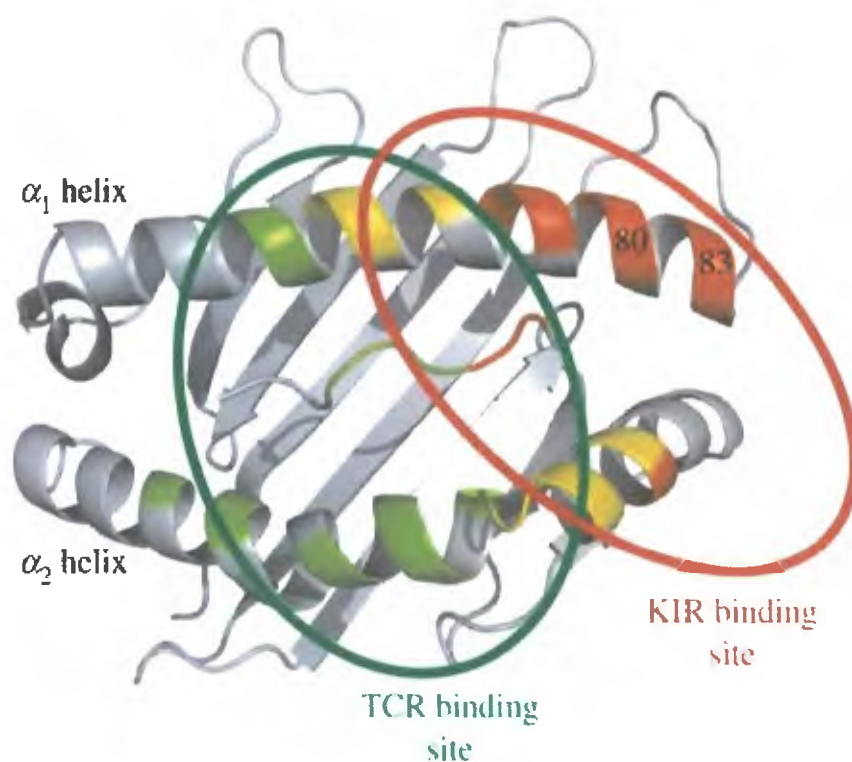


Fig. 5. Los receptores tipo inmunoglobulina de las células NK (KIR) y el receptor de células T $\alpha\beta$ (TCR) se unen en sitios de superposición sobre la molécula HLA clase I. Las áreas de unión de KIR y TCR para la molécula HLA clase I están dados por las líneas rojo y verde respectivamente.

GENOTIPOS KIR Y ENFERMEDAD

Diversos estudios han demostrado la presencia de combinaciones específicas entre los genes KIR y sus ligandos HLA que parecen influir en el curso clínico de diferentes enfermedades. Algunos grupos han propuesto modelos de combinaciones específicas KIR – HLA que determinan la tendencia activadora o inhibidora de las células NK y que además determinan la susceptibilidad o resistencia no modifican el curso clínico de ciertas patologías (Rajagopalan & Long , 2005; Williams *et al.*, 2005; Nelson *et al.*, 2004).

Se han documentado asociaciones entre KIR3DS1 y subgrupos de alelos HLA que

poseen el superdeterminante Bw4 (aquellos que tienen Ile en la posición 80 de la cadena alfa), con la progresión lenta de la infección por VIH (Martin *et al* , 2002)

En el caso de la infección por el virus de hepatitis C (VHC) se ha descrito que la homocigosis para HLA C del grupo 1 y KIR2DL3 se asocia con la eliminación espontánea de la infección. Se ha propuesto la hipótesis de que la unión entre KIR2DL3 y HLA del grupo C-1 es de menor afinidad físicoquímica comparada con la unión de los receptores KIR2DL1 y KIR2DL2 con su ligando HLA C del grupo 1 (Khakoo *et al* , 2004). Estas diferencias en afinidad resultarían en la reducción de la inhibición de las NK, favoreciendo la activación y por lo tanto el control de la infección.

Las combinaciones de ciertos genotipos KIR – HLA también se han asociado con la susceptibilidad a enfermedades autoinmunes. Ejemplo de esto es la combinación KIR2DS1 y/o KIR2DS2 adicional a la homocigosis de un grupo HLA – C que favorece a la susceptibilidad de artritis psoriática (Nelson *et al* , 2004). Esta susceptibilidad podría ser el resultado de la disminución de la inhibición de las células NK. La presencia de KIR2DS1 en combinación con HLA- Cw6 es un factor de riesgo para el desarrollo de psoriasis vulgar (Luszczek *et al* , 2004). Las combinaciones KIR – HLA que favorecen la activación de células T o de células NK, evolutivamente han sido seleccionadas para mejorar la resistencia a infecciones o neoplasias (Naumova *et al* , 2005), a pesar de aumentar el riesgo al desarrollo de autoinmunidad. Las combinaciones KIR – HLA que favorecen la inhibición también han sido asociadas con preclamsia (Hiby *et al* , 2004), una condición con alta mortalidad causada por una remodelación incompleta de las arterias espirales en la decidua materna y por hipertensión durante el embarazo. La remodelación vascular es necesaria para brindar al feto un aporte sanguíneo adecuado. La

susceptibilidad a esta condición se asocia con la combinación de HLA C del grupo 2 expresado en trofoblastos fetales y KIR2DL1 presentes en células maternas y la ausencia de genes KIR2DS activadores (Hiby *et al* , 2004) Se plantea la hipótesis que el KIR2DL1 confiere una fuerte inhibición comparado con el KIR2DL2 o KIR2DL3, lo cual previene la activación de células NK durante la interacción con trofoblastos fetales en la decidua.

KIR y EVOLUCIÓN

Cuando se compara un rango de especies mamíferas ha mostrado que la mayoría no tienen una familia diversificada de genes KIR (Figura 6) Por ejemplo, el Locus KIR aparece eliminado para el genoma de perros y gatos, y en el genoma del ratón los dos genes KIR no están en el LCR, pero sí sobre el cromosoma X (Welch *et al* , 2003), con solamente uno expresado por las células NK. En las focas solo presentan un gen KIR conservado y funcional (Hammond *et al* , 2009), pero en los prosimios el único gen KIR es no funcional (Averdam *et al.*, 2009). Actualmente familias diversificadas de genes KIR han sido encontradas solamente para simios primates (monos, simios y la especie humana) y en ganado vacuno, un rumiante (Guethlein *et al* , 2002, Hershberger *et al* , 2001, Khakoo *et al* , 2000)

En humanos y chimpancés, la especie viviente más cercanamente relacionada al humano, ambos presentan 13 genes KIR, donde solamente 3DL3, 2DL4, 2DL5 y 2DS4 son ortólogos (Khakoo *et al* , 2000). Los genes marcos del Locus KIR en las dos especies son similares pero la distribución de los genes dentro de estos genes marcos es cualitativamente diferente (Sambrook *et al* , 2005) (Abi – Rached *et al* , 2010). Considerando el contenido de genes variables en el locus KIR humano el cual está

distribuido entre regiones centroméricas y teloméricas, todos los 10 genes KIR en el chimpancé que contribuyen a la variabilidad del contenido de genes están empaquetados en la región centromérica.

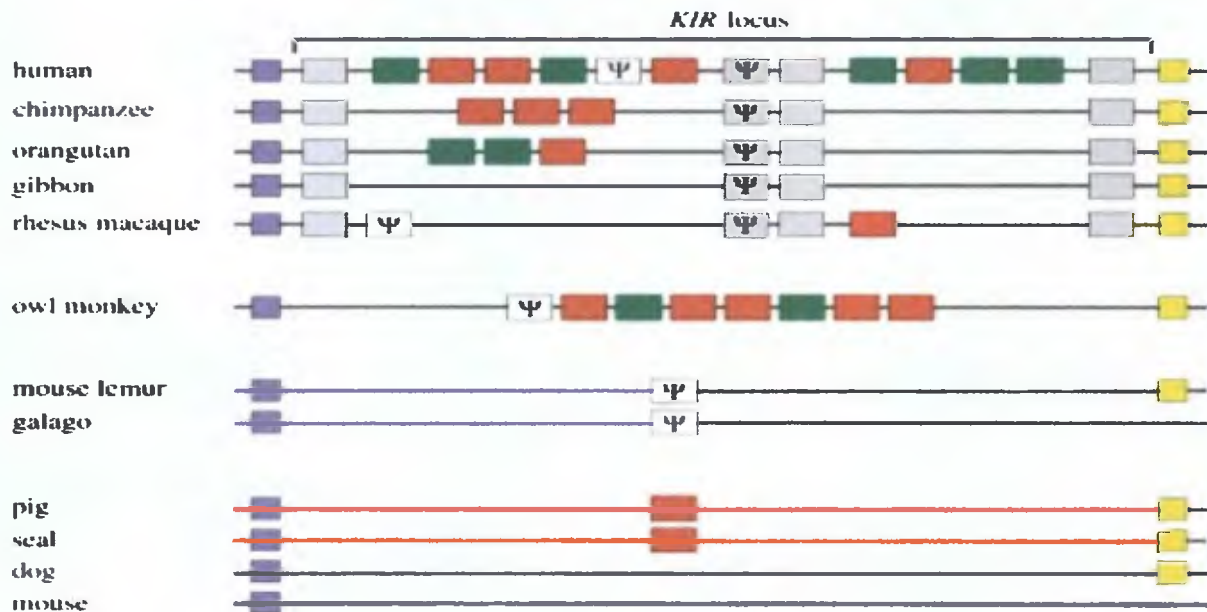


Fig. 6. Comparación del Locus KIR humano con otras especies primates y no primates. Un solo haplotipo KIR representativo es mostrado para cada especie. Las cajas de color gris indican los genes marcos. Los otros genes presentan colores de acuerdo a la clase de receptor que ellos codifican: rojos para KIR inhibidores, verdes para KIR activadores, morado para el Receptor tipo Inmunoglobulina de Leucocito (LILR); amarillo receptor Fc de IgA; blanco, Ψ, pseudogen. Fuente: Parham *et al.*, 2012

MECANISMO DE REGULACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS RECEPTORES KIR

Las células NK y los linfocitos T no expresan todos los genes KIR presentes en una misma célula, sino que lo hacen de manera clonal, cada una de las células expresa y mantiene un número determinado de receptores en cada clon. Se ha especulado que mecanismos epigenéticos en lugar de diferencias en los promotores KIR, pueden ser

responsables de establecer y mantener los patrones de expresión diferencial de los KIR. En este contexto, la metilación de citosinas en dinucleótidos CpG, representa una modificación epigenética frecuente y en la mayoría de los casos está asociada con inhibición de la transcripción. Por otro lado, los patrones de metilación del ADN permanecen sobre numerosas divisiones celulares. Por lo tanto, la metilación del ADN es potencialmente capaz de diversificar patrones de expresión génica en la progenie celular. Se han identificado grupos CpG corriente arriba de la región proximal de los genes KIR (Santourlidis *et al* , 2002). Islas CpG altamente metiladas corresponden a no expresión de KIR, mientras las que corresponden a KIR expresados están no metilados. Esta correlación entre el estado de metilación de islas CpG y su actividad transcripcional de los genes KIR fue observado tanto en líneas celulares de células NK como también de células NK obtenidas de sangre periférica. (Santourlidis *et al* , 2002).

VARIABILIDAD ALÉLICA DE LOS KIR

Existe polimorfismo alélico en todos los genes KIR y esta variabilidad contribuye a la diversidad de los genes KIR. Este polimorfismo ocurre principalmente por mutaciones puntuales y recombinación homóloga (Rajalingam, 2012). En la última actualización de la base de datos de la web IPD- KIR hasta octubre de 2013 estaban registrados 678 alelos KIR. Entre los genes KIR el que presenta mayor polimorfismo alélico es el KIR3DL3 con 108 secuencias descritas. Este polimorfismo en los genes KIR pueden tener un significado funcional. Polimorfismo presente en KIR2DL2 hacen que este receptor tenga una mayor afinidad por moléculas HLA C de grupo C-1 que KIR2DL3 (Moesta *et al* , 2008).

GENERACIÓN DE LA DIVERSIDAD DE HAPLOTIPOS KIR

Los genes KIR presentan similitudes en su orientación dentro del Locus, cada uno separado solamente por 1 – 2 kb de distancia entre ellos. El único tramo de secuencia única, una región de 14 – kb de longitud compuesta por elementos de repetición de ADN se encuentra en la region central entre los genes marco KIR3DP1 y KIR2DL4 (Wilson *et al* , 2000). Múltiples eventos de recombinación reciproca en el centro del complejo KIR, entre 3DP1 y 2DL4 presumiblemente diversifican el contenido de genes para los haplotipos a través de individuos y poblaciones (Yawata *et al* , 2002, Norman *et al* , 2009). Eventos de recombinación también se reportan fuera de la región entre 3DP1 y 2DL4. Estos son generalmente entrecruzamientos no alélicos generando varios haplotipos inusuales, incluyendo haplotipos truncados los cuales han perdido alguno de los genes marco (Hsu *et al* , 2002, Shilling *et al* , 2002) o haplotipos elongados que contienen genes duplicados (Ordonez *et al* , 2008).

TECNOLOGIA LUMINEX

La tipificación de los genes KIR presentes en cada una de las muestras utilizando el KIT de tipificación LIFECODES KIR – SSO, utiliza oligonucleótidos de secuencia específica (SSO) para identificar cual loci KIR está presente en la muestra amplificada de PCR. En esta amplificación de ADN uno de los cebadores está en relativo exceso con respecto al otro cebador, por lo cual la reacción generará algunos productos de ADN de una sola hebra además de los productos de doble hebra. Durante los ciclos iniciales de la amplificación utilizando LIFECODES, productos de ADN de doble hebra serán

generados. Una vez el cebador que está limitado se agota, el cebador restante utiliza el producto de doble hebra como templado para generar ADN de una sola hebra. Este método genera ambos productos, de doble hebra y de una sola hebra. Durante la desnaturalización ambas hebras podrán participar en la reacción de hibridación. Las sondas son diseñadas para que cada una de ellas hibride de forma preferencial a una región complementaria que puede o no estar presente en el ADN amplificado. El análisis de los resultados generados por la tipificación SSO puede ser utilizado para determinar la presencia o ausencia de una secuencia particular de ADN en el amplificado y poder identificar el posible loci en cada muestra. En este procedimiento las sondas están unidas a microesferas diseñadas para utilizar con el instrumento Luminex. Cerca de 100 diferentes poblaciones de microesferas Luminex pueden estar mezcladas y analizadas con el equipo Luminex debido a que cada población de microesfera puede ser distinguida por su única fluorescencia o color. El equipo Luminex es capaz de cuantificar la cantidad relativa de producto de PCR marcado en la hibridación para cada microesfera. Por lo tanto, la señal relativa obtenida de la sonda SSO en el ensayo, puede ser utilizado para asignar la sonda como positiva o negativa en la muestra de ADN amplificado.

METODOLOGÍA

- 1 TIPO DE ESTUDIO Retrospectivo, Descriptivo
- 2 UNIVERSO Las muestras de ADN fueron obtenidas de donantes de Células Progenitoras Hematopoyéticas entre el periodo comprendido 2000 – 2014, provenientes de tres hospitales panameños Instituto Oncológico Nacional (I O N), Hospital del Niño (H N) y el Complejo Hospitalario Metropolitano (C H M)
- 3 MUESTRAS Un total de 116 muestras de donantes de células progenitoras hematopoyéticas fueron analizadas las cuales comprenden el total del Universo
- 4 MÉTODO

4.1 EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS (ADN)

Las muestras de ADN genómico fueron extraídas utilizando el KIT de extracción QIAamp DNA Blood Kit (Qiagen) El protocolo de purificación de ADN de sangre completa se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante Se agregó 200 μ L de sangre completa a un microtubo de 1.5 mL que contenía 20 μ L de proteasa QIAGEN para la eliminación inicial de las proteínas Seguidamente se agregó 200 μ L de Buffer AL a la muestra y se mezcló el microtubo utilizando un vortex para promover la lisis de hematíes La muestra se incubó en un baño a 56° C por un período de 10 min. Una vez terminado el periodo de incubación, el microtubo se centrifugó para remover gotas que hayan quedado en la tapa. Se agregó 200 μ L de etanol (96 – 100 %) a la muestra y se realizó vortex por 15 segundos para mezclarlo Inmediatamente se centrifugó el microtubo de 1.5 mL para

remover las gotas que hayan quedado en la tapa. La mezcla fue transferida a una columna QIAamp estéril, se cerró la tapa del microtubo de 1.5 mL y se centrifugó a 8000 rpm por 1 min. Al terminar se colocó la columna en un tubo colector de 2 mL limpio y el tubo que contiene el filtrado fue descartado. Cuidadosamente se abrió la columna QIAamp y se agregó 500 µL de buffer AW1. Se cerró la tapa y se centrifugó a 8000 rpm por 1 minuto. Luego se colocó la columna QIAamp en un tubo colector de 2 mL limpio y el tubo que contiene el filtrado se descartó. Luego se abrió cuidadosamente la columna QIAamp y se agregó 500 µL de buffer AW2. Se cerró la tapa y se centrifugó a 14,000 rpm por 3 minutos. Una vez terminada la centrifugación, la columna QIAamp se colocó en un nuevo tubo colector y el tubo con el filtrado se descartó. Nuevamente el tubo se centrifugó por 1 min a 14,000 rpm para evitar una posible contaminación de la columna con el buffer AW2. Finalmente, la columna QIAamp se colocó en un tubo estéril de 1.5 mL. Se le agregó 200 µl de agua ultra pura de grado molecular. Se incubó a temperatura ambiente (15- 25°C) por 1 minuto. Y luego se centrifugo a 8000 rpm por 1 minuto.

4.2 MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ADN

La concentración de ADN de cada una de las muestras fue determinada antes de la etapa de amplificación de la PCR. Las lecturas fueron realizadas utilizando un fluorómetro (Qubit fluorometer invitrogen). Las muestras de ADN fueron ajustadas hasta obtener una concentración final de 10 µg/mL. Este ajuste se realizó utilizando la siguiente Ecuación

$$\text{Concentración}_{\text{inicial}} \times \text{Volumen}_{\text{inicial}} = \text{Concentración}_{\text{final}} \times \text{Volumen}_{\text{final}}$$

4.3 CONTROL DE CALIDAD

Control Negativo Para cada corrida antes de la etapa de amplificación de la PCR se incluyo un control negativo, el cual contiene la mezcla maestra con los cebadores y la Taq polimerasa, pero no presenta el ADN del paciente, sino H₂O de grado molecular. En la etapa de hibridación este control no generaría lectura.

Control Positivo Para cada muestra a ser analizada para presencia o ausencia de genes KIR, LIFECODES contiene dos sondas designadas como CON 100 y CON 200 las cuales hibridan para el Locus KIR3DP1 y KIR3DL3, respectivamente. Este actúa como control interno para verificar que la reacción de PCR y la hibridación han trabajado adecuadamente. Si no se obtiene un valor mínimo para estas dos sondas, las muestras no pueden producir una tipificación correcta y esta debe ser repetida nuevamente.

4.4 AMPLIFICACIÓN DE LOS GENES KIR

Para determinar los genes presentes en cada individuo se realizarán dos reacciones de PCR para la amplificación de los exones 4, 5, 7, 8, y 9. Un tubo contiene la siguiente mezcla: 9.8 µL de H₂O grado molecular, 6 µL de cebador MX-K1, 0.2 µL Taq polimerasa (concentración 5u/µL Promega GoTaq DNA Polymerase) y 4 µL de ADN del paciente. El otro tubo tendrá 9.8 µL de H₂O grado molecular, 6 µL de cebador MX-K2, 0.2 µL Taq polimerasa (concentración 5u/µL Promega GoTaq DNA Polymerase) y 4 µL de ADN del paciente. Las condiciones de amplificación para cada tubo fueron (ver Cuadro II).

CUADRO II
PROGRAMA DE AMPLIFICACIÓN EN EL TERMOCICLADOR

Nº de Ciclos	Temperatura	Tiempo
1 ciclo	95° C	2 min
40 ciclos	94 ° C	30 seg
	59° C	90 seg
	72 °C	30 seg
1 ciclo	72°C	15 min
	4°C	∞

4.5 HIBRIDACIÓN DE LOS PRODUCTOS DE PCR AMPLIFICADO

La hibridación de los productos de PCR amplificados se realizó de acuerdo al protocolo descrito por el fabricante. Se calentó la sonda en un bloque de calor de 55°C - 60°C de 5 a 10 min. El termociclador debe tener temperatura de 56°C. Se procedió a incubar la sonda durante 10 min a 56°C. Una vez transcurrido este período se agitó el tubo conteniendo la sonda durante 15 segundos con un vórtex. Luego se colocó 5 µL del producto de PCR del locus específico en un plato de fondo V para termociclador. Se añadió 15 µL de la mezcla de sondas al pocillo que contenía el producto de PCR y se selló. El plato se colocó en el termociclador para realizar la hibridación por 20 minutos a una temperatura de 56°C.

En otro tubo aparte se preparó Streptavidina - Ficoeritrina (SA - PE). Luego se dispensó 170 µL de SA -PE a cada uno de los pocillos que contenía los amplicones producto de la amplificación. Se retiró el plato con las muestras del termociclador y se colocó en el equipo Luminex para ser analizadas. La hibridación de la sonda específica

con su secuencia complementaria en el amplificado, determina la presencia del gen en la muestra de ADN

4.6 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El porcentaje de individuos que presentan cada gen KIR fue determinada por conteo directo (individuos positivos para la presencia del gen / número total de individuos en la población x 100)

El haplotipo KIR fue inferido del genotipo

Haplotipo A = $(\text{Número de individuos AA} \times 2) + \text{Número de individuos AB} / 2n$

Haplotipo B = $(\text{Número de individuos BB} \times 2) + \text{Número de individuos AB} / 2n$

Donde N_{AA} , N_{AB} y N_{BB} son los números de los genotipos AA, AB, y BB, y "n" es el número total de individuos

RESULTADOS

FRECUENCIA DE GENES KIR

La presencia y ausencia de los 16 genes KIR (14 genes y 2 pseudogenes) determinados en donantes de células progenitoras hematopoyéticas, es mostrado en el cuadro # 3. Todos los 16 genes KIR fueron observados en la población de donantes y los genes marco 3DL3, 3DP1, 2DL4 y 3DL2 estuvieron presentes en todos los individuos estudiados. Los genes KIR más frecuentemente encontrados fueron 2DL1 (98.3 %), 2DL2 (49.1 %), 2DL3 (86.2 %), 3DL1 (91.4 %), 2DL5 (62.1 %), 2DS1 (44 %), 2DS2 (47.4 %), 2DS3 (25 %), 2DS4 (91.4 %), 2DS5 (45.7 %), 3DS1 (41.4 %), 2DP1 (98.3 %).

FRECUENCIA DE HAPLOTIPOS KIR

Basados en la presencia o ausencia de los 16 genes KIR que se determinaron en los 116 donantes de células progenitoras hematopoyéticas se pudieron identificar los siguientes haplotipos KIR. 30 donantes presentaron genotipo AA (25.9 %), 53 presentaron genotipo AB (45.7 %) y 33 presentaron genotipo BB (28.4 %). Dentro del genotipo AB, el genotipo más frecuente identificado (18) estaba constituido por los siguientes genes KIR (3DL3, 2DL3, 2DL5, 2DS5, 2DP1, 2DL1, 3DP1, 2DL4, 3DL1, 3DS1, 2DS1, 2DS4, 3DL2) el cual representa 15.5% del total de donantes estudiados. En el genotipo BB, el genotipo más frecuente identificado (7) estaba constituido por los siguientes genes KIR (3DL3, 2DS2, 2DL2, 2DL5, 2DS3, 2DP1, 2DL1, 3DP1, 2DL4, 3DL1, 2DS4, 3DL2) el cual representa el 6.0% del total de donantes estudiados.

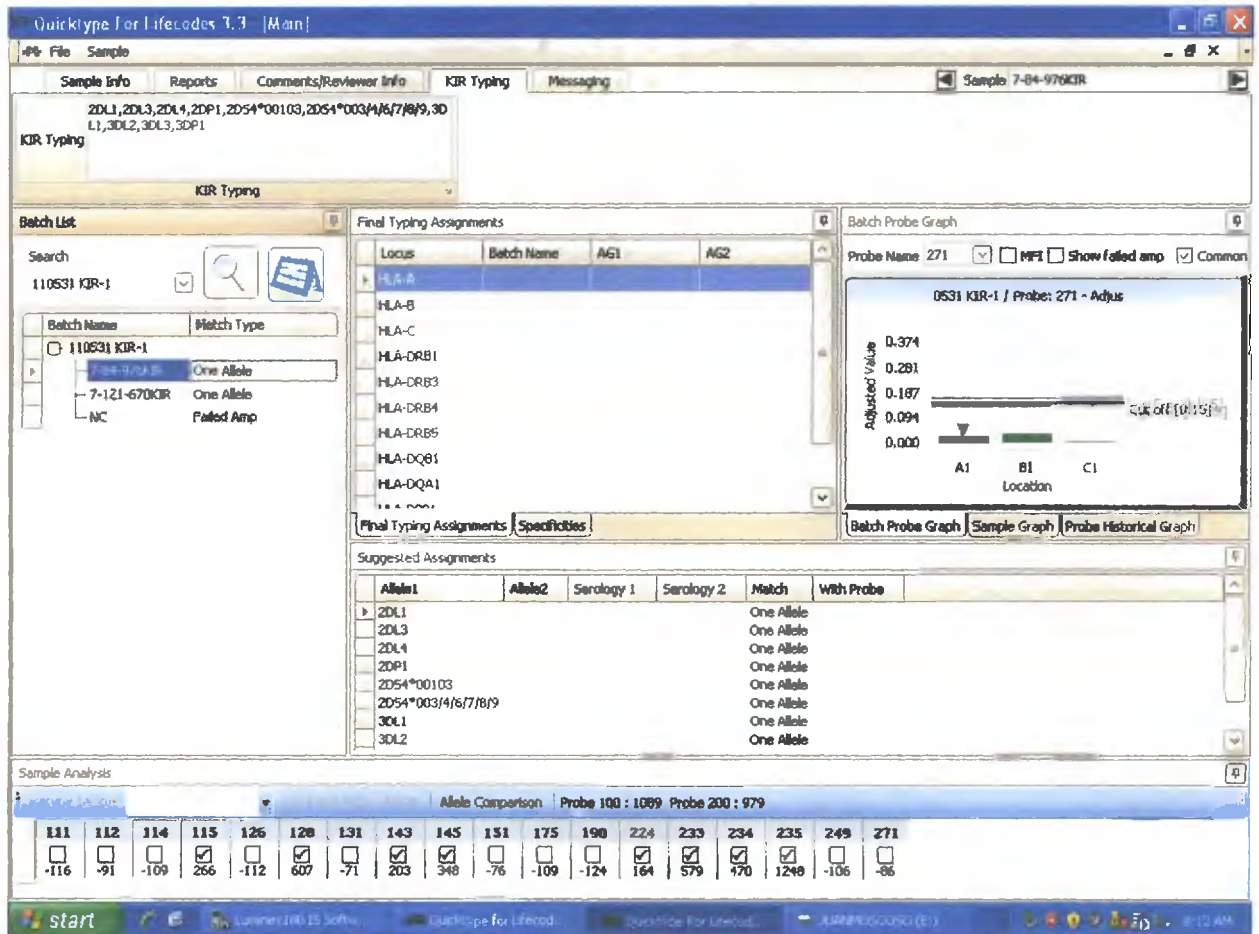


Fig. 7. La pantalla del ordenador muestra en su parte inferior las sondas que resultaron positivas producto de la hibridación con la secuencia complementaria en la muestra de ADN amplificado del paciente por medio de un gancho. En el caso que se muestra las sondas que hibridaron corresponden a los siguientes genes KIR (Sonda 115: KIR2DP1; Sonda 128: KIR3DL1; Sonda 143: KIR2DL1; Sonda 145: KIR2DS4; Sonda 224: KIR3DL2; Sonda 233: KIR2DL4; Sonda 234: KIR2DS4; Sonda 235: KIR2DL3).

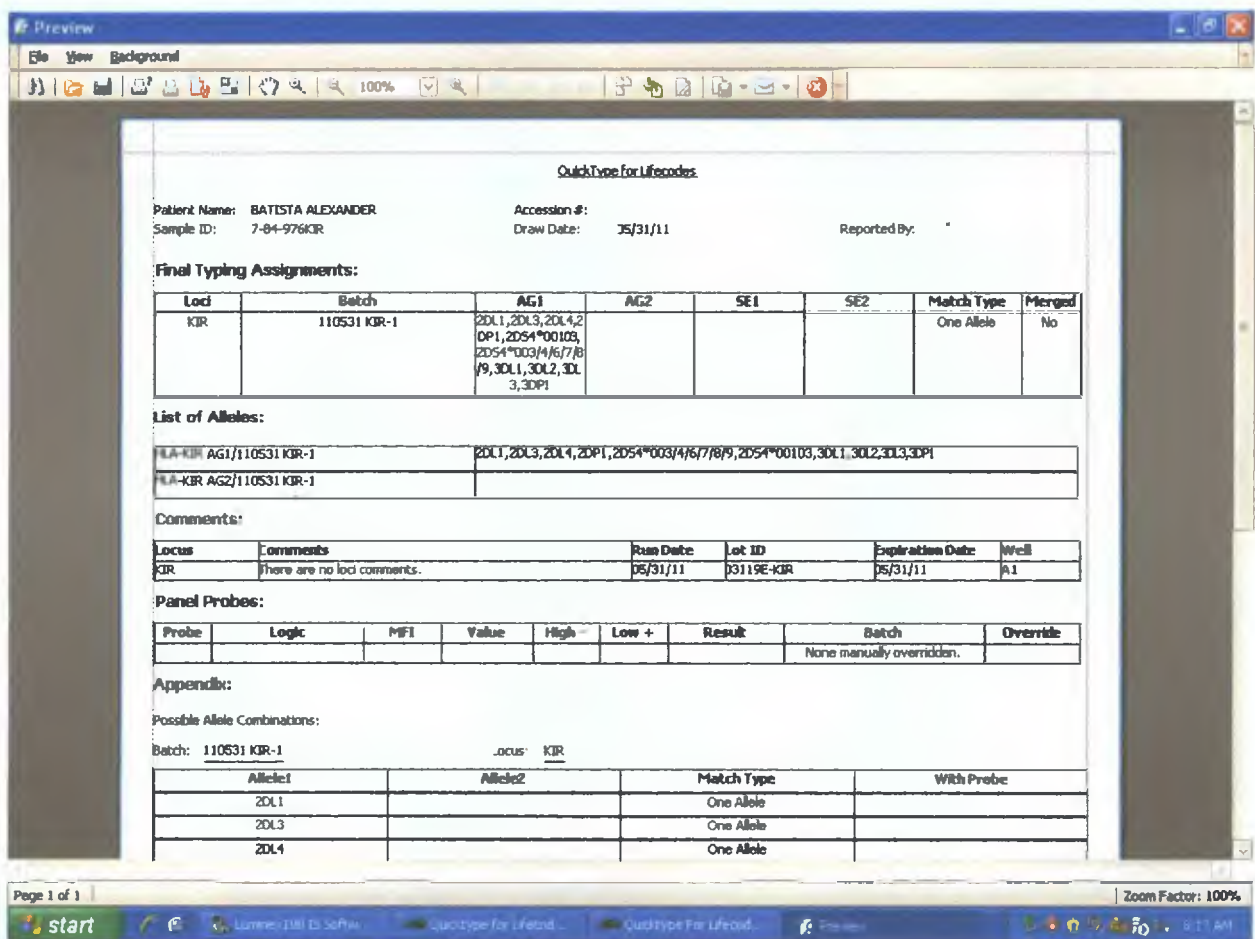


Fig. 8. La pantalla muestra los genes KIR identificados en el donante según la presencia de los mismos en el ADN genómico. En este caso el donante presenta la siguiente tipificación de genes KIR: 2DL1, 2DL3, 2DL4, 2DP1, 2DS4, 3DL1, 3DL2, 3DL3, 3DP1.

CUADRO III.

FRECUENCIA DE GENES KIR ACTIVADORES E INHIBIDORES EN DONANTES DE CÉLULAS PROGENITORAS HEMATOPOYÉTICAS

Número de donantes estudiados n = 116	
KIR	%F (N)
Genes KIR Inhibidores	
2DL1	98.3 (114)
2DL2	49.1 (57)
2DL3	86.2 (100)
3DL1	91.4 (106)
3DL2	100 (116)
3DL3	100 (116)
2DL4	100 (116)
2DL4	100 (116)
2DL5	62.1 (72)
Genes KIR Activadores	
2DS1	44.0 (51)
2DS2	47.4 (55)
2DS3	25.0 (29)
2DS4	91.4 (106)
2DS5	45.7 (53)
3DS1	41.4 (48)
Pseudogenes	
2DP1	98.3 (114)
3DP1	100 (116)

La Frecuencia (% F) que lleva cada gen es expresada como porcentaje y definida como el número de individuos que llevan el gen (N) dividido entre el número de individuos estudiados (n) en la población estudiada.

CUADRO IV FRECUENCIA DE GENOTIPOS KIR

Genotipos	Nº de Genotipos ID	3DL3	2DS2	2DL2	2DL3	2DL5	2DS3	2DS5	2DP1	2DL1	3DP1	2DL4	3DL1	3DS1	2DS1	2DS4	3DL2	Frecuencia %
AA	30	*			*				*	*	*	*	*			*	*	25.9
AB	18	*			*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	15.5
AB	9	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	7.8
AB	8	*	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*			*	*	6.9
AB	8	*	*	*	*				*	*	*	*	*			*	*	6.9
BB	7	*	*	*		*	*		*	*	*	*	*			*	*	6
BB	3	*			*	*		*	*	*	*	*		*	*		*	2.6
BB	3	*	*	*		*	*		*	*	*	*	*		*	*	*	2.6
BB	3	*			*	*		*	*	*	*	*		*	*		*	2.6
BB	2	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*		*	*		*	1.7
AB	2	*		*	*	*		*	*	*	*	*	*			*	*	1.7
BB	2	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*		*	*	1.7
BB	2	*	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	1.7
BB	2	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*		*	*		*	1.7
AB	1	*	*		*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0.9
BB	1	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*		*		*	*	0.9
BB	1	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*		*	*	0.9
BB	1	*	*		*	*		*	*	*	*	*	*			*	*	0.9
AB	1	*			*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	0.9
BB	1	*	*	*		*		*			*	*	*		*	*	*	0.9
AB	1	*			*	*	*		*	*	*	*	*			*	*	0.9
BB	1	*	*	*	*				*	*	*	*	*	*		*	*	0.9
BB	1	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*		*	0.9
BB	1	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*		*	0.9
AB	1	*		*	*				*	*	*	*	*			*	*	0.9
BB	1	*			*				*	*	*	*	*				*	0.9
BB	1	*			*				*	*	*	*	*			*	*	0.9
BB	1	*	*	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*		*	0.9
AB	1	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0.9
BB	1	*	*	*		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	0.9
AB	1	*			*				*	*	*	*	*	*		*	*	0.9
AB	1	*	*	*		*		*	*	*	*	*	*			*	*	0.9
AB	1	*			*	*		*	*	*	*	*	*			*	*	0.9
Total	116																	

CUADRO V

FRECUENCIA DE GENOTIPOS Y PROPORCION DE HAPLOTIPOS KIR

GENOTIPO	N	FRECUENCIA (%)
AA	30	25.9
AB	53	45.7
BB	33	28.4
TOTAL	116	100
HAPLOTIPO		
A	49	
B	51	
A B PROPORCIÓN	1 1.04	

El haplotipo A y B se determinaron utilizando la siguiente fórmula grupo $A = \frac{2N_{AA} + N_{AB}}{2n}$ y el grupo $B = \frac{2N_{BB} + N_{AB}}{2n}$, donde N_{AA} , N_{AB} y N_{BB} son los números de los genotipos AA, AB, y BB, n = número total de individuos

CUADRO VI
FRECUENCIA DE GENES KIR EN PORCENTAJE (%) EN PANAMÁ COMPARADA
CON FRECUENCIAS REPORTADAS EN OTRAS POBLACIONES

POBLACIÓN	N	3DL3	2DS2	2DL2	2DL3	2DL5	2DS3	2DS5	2DP1	2DL1	3DP1	2DL4	3DL1	3DS1	2DS1	2DS4	3DL2
PANAMA	116	100	47.4	49.1	82.6	62.1	25.0	45.7	98.3	98.3	100	100	91.4	41.4	44.0	91.4	100
BRAZIL	70	100	53.3	52.2	94.4	58.9	38.9	32.2	96.7	96.7	100	100	95.6	41.0	37.8	95.6	100
JAPON	41	100	15.0	15.0	100	39.0	15.0	25.0	100	100	100	100	97.0	30.0	35.0	97.0	100
KOREA	154	100	16.9	14.3	99.4	38.3	16.2	26.6	100	99.4	100	100	94.2	36.4	37.7	94.2	100
AFRO-CARIBEÑOS	54	NT	52.0	54.0	91.0	33.0	24.0	30.0	NT	91.0	NT	NT	98.0	17.0	17.0	78.0	NT
HINDUS NORTE DE INDIA	72	100	62.5	79.2	65.3	79.2	43.1	47.2	NT	87.5	NT	100	87.5	38.9	54.2	80.6	100
REP. CHECA	125	100	57.0	59.0	86.0	52.0	36.0	26.0	94.0	95.0	100	100	94.0	38.0	43.0	92.0	100
ARGENTINA	102	100	54.5	62.5	86.5	55.7	28.6	35.4	96.1	96.1		100	95.0	42.0	45.4	95.0	100
HONGKONG	100	100	28.0	28.0	98.0	45.0	25.0	26.0	99.0	99.0	100	100	94.0	39.0	40.0	94.0	100

NT No Tipificado

DISCUSIÓN

El sistema inmunológico humano ha desarrollado una estrategia de gran diversidad, ejemplificada por el MHC, cuyo contenido de genes variables y el polimorfismo alélico se combina para individualizar el genotipo HLA. Al igual que el HLA, la región KIR está emergiendo rápidamente como una región igualmente diversa que utiliza las estrategias evolutivas similares de contenido de genes variables y el polimorfismo para alcanzar profundidades similares de diversidad. Estudios poblacionales han generalmente utilizado métodos de tipificación de genes KIR en ADN genómico para determinar la presencia o ausencia de cada gen KIR y han demostrado que entre individuos, el contenido de genes KIR puede variar considerablemente.

La frecuencia de genes KIR presentes en nuestra población fue comparada con las frecuencias encontradas en poblaciones como Brasil, Japón, Corea del Sur, Afro-Caribeños, Norte de India, República Checa, Argentina y Hong Kong.

Los genes que codifican para receptores inhibidores, se encuentran en una mayor frecuencia en la población que los que codifican para receptores activadores y los resultados son comparables con los reportes de otros estudios (Niokou *et al* , 2003). La frecuencia de los genes KIR en nuestra población variaba de 25.0% (2DS3) hasta 100% para los genes marco 3DL3, 2DL4, 3DL2, 3DP1. Exceptuando el gen KIR activador 2DS4 (91.4%) ningún otro gen activador alcanzó una frecuencia de 50%. Los tres genes funcionales (3DL3, 2DL4, 3DL2) y un pseudogen (3DP1) marcan los límites que dividen

en dos regiones al complejo de genes KIR. Los KIR3DL3 y KIR3DP1 (pseudogen) flanquean la región centromérica mientras que KIR2DL4 y KIR3DL2 en la región telomérica. Estos genes son denominados “marco” debido a que la mayoría de los haplotipos KIR incluye estos loci. Muy pocos haplotipos carentes de KIR2DL4 han sido descritos (Norman *et al* , 2002, Ordoñez *et al* ,2008)

El gen KIR2DP1 en nuestra población presentó una frecuencia de 98.3%, al comparar su frecuencia en poblaciones de Brasil, Japón, Corea del Sur, República Checa, Argentina y Hong-Kong encontramos frecuencias similares (por encima del 94%)

En nuestra población el gen KIR2DL1 presentó una frecuencia del 98.3% similar a la frecuencia reportada para poblaciones de Brasil, Japón, Corea del Sur, República Checa, Argentina y Hong-Kong. En estas poblaciones las frecuencias fueron de alrededor de 95%. En poblaciones del Norte de India y Afro-Caribeños este gen presenta frecuencias menores de 87.5% y 91.0% respectivamente.

El gen KIR3DL1 presentó frecuencia en nuestra población de 91.4%, con similares resultados encontradas en las demás poblaciones con excepción de las del Norte de India que presentaron una frecuencia de 87.5%.

El gen KIR2DS4, el único gen activador en el haplotipo AA, presentó una frecuencia mayor al 90% en nuestra población con resultados similares al resto de las poblaciones con excepción de los Afro-Caribeños y pobladores del Norte de India en donde la frecuencia fue de 78% y 80.6%, respectivamente.

El gen KIR2DS2 presentó una frecuencia de 47.4%, similar a las reportadas para poblaciones de Brasil, Afro-Caribeños, República Checa y Argentina cuyo rango estaba entre el 52.0% - 57.0%. Sin embargo, la frecuencia en nuestra población fue mayor a la

reportada poblaciones de Japón, Corea del Sur y Hong-Kong pero menor a la observada en el Norte de India (62.5%).

El gen KIR2DL2 presentó una frecuencia de 49.1%, mucho menor a la reportada en poblaciones de Argentina y del Norte de India cuyas frecuencias fueron de 62.5% y 79.2%, respectivamente. Las frecuencias de este gen en poblaciones de Japón (15.0%), Corea del Sur (14.3%) y Hong-Kong (28%) fueron considerablemente menores que la observada en nuestra población.

El gen inhibidor KIR2DL5 en nuestra población presentó niveles de 62.1%, superiores a las frecuencias encontradas en poblaciones de Brasil, Japón, Corea del Sur, Afro-Caribeños, República Checa, Argentina y Hong-Kong. Solamente la población del Norte de India presentó una frecuencia de 79.2%, mayor a la nuestra.

El gen activador KIR2DS3 presentó una frecuencia de 25.0%, muy similares a las encontradas en poblaciones de Afro-Caribeños (24%), Hong-Kong (25.0%) y Argentina (28.6%), respectivamente. Las frecuencias de este gen fueron de 15.0% y 16.2% en poblaciones de Japón y Corea del Sur, correspondientemente.

El gen KIR2DL3 presentó en nuestro estudio una frecuencia de 82.6%, al compararla con las de las poblaciones de Brasil, Japón, Corea del Sur, Afro-Caribeños, República Checa, Argentina y Hong-Kong se observa que estas presentaron frecuencias por encima del 86%. La única población con frecuencias menores a la nuestra fue la de Norte de India (65.3%).

El gen activador KIR2DS5 presentó una frecuencia similar a la población del Norte de India (45.7% Panamá y 47.2% Norte de India). Esta frecuencia estuvo por encima de las encontradas en poblaciones como Brasil, Japón, Corea del Sur, Afro-Caribeños,

República Checa, Argentina y Hong-Kong cuyas frecuencias oscilaban entre el 25 0% hasta el 35 4%

En nuestra población el gen activador KIR3DS1 presentó una frecuencia de 41 4%, similar a las encontradas en las poblaciones de Brasil, Norte de India, República Checa, Argentina y Hong-Kong. Las poblaciones de Afro-Caribeños, Japón y Corea del Sur presentaron frecuencias menores a las encontrada en nuestro estudio 17.0%, 30 0%, 36 4%, respectivamente; mucho menores a las encontradas en nuestro estudio

Para el gen KIR2DS1 nuestra población presenta una frecuencia similar a las encontradas en poblaciones de Hong-Kong, Argentina y República Checa. Siendo nuestra frecuencia para este gen superior a las encontradas en poblaciones de Afro-Caribeños, Japón y Corea del Sur. Sin embargo, la población del Norte de India presenta una frecuencia mayor que la encontrada en nuestra población

La frecuencia de los haplotipos determinados se muestra en el cuadro IV. En total se identificaron 31 genotipos diferentes en nuestra población de 116 donantes de células progenitoras hematopoyéticas. Todos los genotipos fueron asignados como haplotipos AA, AB o BB basados en el contenido de genes que presentaban. Genotipos que contenían genes que pertenecen al haplotipo A (KIR2DL1, 2DL3, 3DL1, 2DS4) y no presentaban genes característicos del haplotipo B (KIR2DS1, 2DS2, 2DS3, 2DS5, 2DL5, y 3DS1) fueron designados como haplotipos homocigóticos AA. A su vez los genotipos que carecían de genes del haplotipo A, pero tenían genes del haplotipo B fueron designados como haplotipos homocigóticos BB. Mientras que aquellos que presentaban la combinación de los genes del haplotipo A y uno o más de los genes del haplotipo B, se asignaban como haplotipo heterocigoto AB.

En nuestra población el genotipo 3DL3-2DL3-2DP1-2DL1-3DP1-2DL4-3DL1-2DS4-3DL2 (que es el haplotipo homocigótico AA) fue el más predominante con un 25.9%, al igual que predomina en otras poblaciones como Japón (56%), Caucásicos del Reino Unido (30.2%) y Vietnamitas (42.4%). Otras poblaciones como los aborígenes Australianos presentan una mayor frecuencia de haplotipos homocigóticos BB (22.4 %) (Toneva *et al* , 2001, Yawata *et al* , 2002)

Todas las poblaciones humanas tienen ambos haplotipos del grupo A y del grupo B, pero su frecuencia varía considerablemente (Parham 2005, Single *et al* , 2007, Yawata *et al* , 2002). En africanos y caucásicos, el haplotipo A y B están distribuidos equitativamente, sugiriendo un balance en la selección. Por el contrario, el haplotipo A está sobrerrepresentado en el Noreste Asiático (China, Japón y Korea), mientras que el haplotipo B ocurre más frecuentemente en los nativos de India, Australia y América. (Ewerthon *et al* , 2007, Flores *et al* , 2007, Gendzekhadze *et al* , 2006, Jiang *et al* , 2005, Norman *et al* , 2002, Rajalingam *et al* , 2008, Toneva *et al* , 2001, Whang *et al* , 2005, Yawata *et al* , 2002). En un análisis comparativo de las poblaciones mundiales, un enlace fue encontrado entre las migraciones humanas prehistóricas y la evolución de los dos grupos de haplotipos diferenciados por su contenido de genes KIR activadores (Yawata *et al* , 2002). Los nativos de América, Australia e India, quienes tenían extensivas migraciones prehistóricas, llevaban alta frecuencia de haplotipos B. Se presume que las poblaciones aborígenes de India, Australia y América adquirieron los genes KIR activadores para sobrevivir a los cambios ambientales durante sus distantes migraciones desde África (Rajalingam *et al* , 2008). Sin embargo, la mayor parte del Noreste Asiático (> 55 %), incluyendo China, Japón y Korea quienes se establecieron en las tierras de

latitudes templadas, donde los cambios ambientales entre verano e invierno son sutiles, llevan solamente haplotipos del grupo A, que presentan un solo receptor KIR activador (Jiang *et al* , 2005; Whang *et al* , 2005; Yawata *et al* , 2002) En Africanos y Europeos, los haplotipos A y B están distribuidos equitativamente, esto sugiere un balance en la selección

En nuestra población el 49% de los haplotipos tenían un grupo A mientras que el 51% restante presenta el grupo B La proporción de haplotipos A B fue 1 1 04 Una probable explicación es el número de individuos estudiados Además, nuestra población es mixta ya que presenta influencia de varios grupos étnicos europeos, africanos, asiáticos e indígenas

En nuestra población logramos identificar la presencia de genes que están involucrados en susceptibilidad a enfermedades Un ejemplo de esto es la presencia del gen KIR2DS1 el cual ha sido asociado con predisposición a la psoriasis. Este es un desorden inflamatorio con manifestaciones sistémicas (Suzuki *et al* , 2004). El gen KIR2DS1 es un componente de haplotipo del grupo B, que es relativamente inusual en los Japoneses quienes en su población presentan una inusual alta frecuencia de haplotipo del grupo A (Yawata *et al* , 2002) Consistente con estas observaciones, KIR2DS1 ha sido asociado con psoriasis en estudios en Suecia y Polonia (Holm *et al* , 2005)

Combinaciones de genotipos particulares HLA- KIR han sido ligados con susceptibilidad a enfermedades autoinmunes tales como en la diabetes tipo I Varios estudios genéticos han revelado la influencia de interacciones HLA-KIR en estas enfermedades (Middleton *et al* , 2006, Namekawa *et al.*, 2000; Van der Slik *et al* , 2003)

Interacciones entre HLA-Bw4 y el gen KIR3DS1 han sido observados en casos de demora en la progresión a SIDA en pacientes HIV, mientras que la homocigosis en ambos HLA-C1 y KIR2DL3 están asociados con la resolución de la infección del virus de hepatitis C. Comprender las bases para estas asociaciones genéticas observadas es complicado por el extensivo polimorfismo encontrado entre los haplotipos KIR, los cuales no solo difieren en la secuencia de nucleótidos sino también en el contenido de genes (Rajagopalan & Long, 2005).

Nuestro estudio se realizó en donantes de células progenitoras hematopoyéticas en los cuales la compatibilidad HLA entre donante y receptor es prerequisite para el éxito del trasplante. Existe evidencia que también otros genes como los genes KIR contribuyen a alcanzarlo. Los donantes que presentan más genes KIR activadores (Haplotipo B) tienen un mayor “efecto Injerto” contra leucemia que los donantes con genes KIR inhibidores (haplotipo A). Nuestros resultados muestran que el 74% de los donantes tenían al menos un haplotipo B lo cual podría tener el efecto anti-leucémico en estos trasplantes.

El análisis de la base de datos del Locus KIR puede ser aplicado para la evaluación de las relaciones genéticas entre poblaciones de diferentes áreas geográficas en estudios antropológicos. Adicionalmente, la determinación de la frecuencia de genes KIR y su distribución en una población puede utilizarse como una buena referencia para estudios genéticos que identifican asociación entre los genes KIR y la susceptibilidad a ciertas enfermedades infecciosas, autoinmunes, reproducción y cáncer.

CONCLUSIONES

El presente estudio nos permite llegar a las siguientes conclusiones

- 1 Existen en nuestra población de los 16 genes KIR hasta ahora conocidos e identificados como KIR activadores e inhibidores
- 2 Los genes KIR inhibidores presentaron mayor frecuencia que los activadores exceptuando el gen KIR activador 2DS4 que presentó una frecuencia de 91.4%
- 3 Es posible predecir los genotipos AA, AB y BB y su frecuencia a través de la presencia de genes y haplotipos A, B
- 4 Los datos de frecuencia de genes KIR en este análisis de la población panameña, aporta valiosa información a la base de datos mundial
- 5 La tipificación e identificación de genes KIR realizada en este estudio contribuye como criterio adicional de la selección de donantes de células progenitoras hematopoyéticas en Panamá

CITAS BIBLIOGRÁFICAS

Abi-Rached L, Moesta AK, Rajalingam R, Guethlein LA, Parham P Human-specific evolution and adaptation led to major qualitative differences in the variable receptors of human and chimpanzee natural killer cells *PloS Genet.* 2010, 6(11) e 10001192 doi 10.1371/journal.pgen.1001192.

Averdam A, Petersen B, Rosner C, Neff J, Ross C, Eberle M, Aujard F, Münch C, Schempp W, Carrington M, Shina T, Inoko H, Knaust F, Coggill P, Sehra H, Beck S, Abi-Rached L, Reinhardt R, Walter L A novel system of polymorphic and diverse NK cell receptors in primates *PloS Genet.* 2009, 5(10) e 1000688 doi 10.1371/journal.pgen.1000688

Bancroft G The role of natural killer cells in innate resistance to infection *Current Opinion in Immunology* 1993, 5 503 - 510

Barten R, Torkar M, Haude A, Trwsdale J, Wilson M Divergent and convergent evolution of NK-cell receptors *Trends in Immunology* 2001, 22 52 - 57

Biron C, Nguyen K, Pien G, Cousens L and Salazar-Mather T Natural Killer Cells in antiviral defense: function and regulation by innate cytokines *Annual Review of Immunology* 1999, 17 189 - 220

Braud V, Allan D, O'Callaghan C, Kalle S, D'Andrea A, Ogg G, Lazetic S, Young N, Bell J, Phillips J, Lanier L, & McMichael A. HLA-E binds to natural killer cell receptors CD94/NKG2A, B and C *Nature* 1998, 391 795 - 799

Caligiuri MA Human natural killer cells *Blood* 2008; 112(3) 461 - 469

Carrington M, Norman P The KIR gene Cluster 2003 Available at [http // www.Ncbi.nlm.nih.gov/books/brookers.fcgi/mono_003/ch1d1.pdf](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/brookers.fcgi/mono_003/ch1d1.pdf) Accessed March 23, 2006

Colonna M, Samaridis J Cloning of immunoglobulin – superfamily members associated with HLA – C and HLA – B recognition by human Natural Killer Cells *Science* 1985, 268 405 – 8

Colucci F, Caligiuri M & Di Santo J. What does it take to make a natural killer? *Nature Reviews Immunology* 2003, 3 413 - 425.

Cooley S, Trachtenberg E, Bergmann TL, et al Donor with group B KIR haplotypes improve relapse – free survival after unrelated hematopoietic cell transplantation for acute myelogenous leukemia. *Blood* 2009, 113 726 – 32

Du Z, Sharm SK, Spellman S, Reed EF, Rajalingam R KIR2DL5 alleles mark certain combination of activating KIR genes *Genes Immunol* 2005, 14 135 – 42

Ewerton PD, Leite M de M, Magalhães M, Sena L, Melo dos Santos EJ Amazonian Amerindians exhibit high variability of KIR profiles *Immunogenetics*. 2007, 59 625 - 630

Flores AC, Marcos CY, Paladino N, Capucchio M, Theiler G Kir genes polymorphism in Argentinean Caucasoid and Amerindian populations *Tissue antigens* 2007, 69 568 - 576

Gendzekhadze K, Norman PJ, Abi-Rached L, Layrisse Z, Parham P High KIR diversity in Amerindians is maintained using few gene-content haplotypes *Immunogenetics* 2006, 58 478 - 480

Gomez – Lozano N, Estefania E, Williams F, Halpenny I, Middleton D, Solis R, Vilches C The silent KIR3DP1 gene (CD158c) is transcribed and might encode a secreted receptor in a minority of humans, in whom the KIR3DP1, KIR2DL4 and KIR3DL1/KIR3DS1 genes are duplicated *Eur J Immunol Rev* 2001 181 p.269 – 78

Gomez – Lozano N, Gardiner CM, Parham P, Vilches C Some human KIR haplotype contain two KIR2DL5 genes KIR2DL5A and KIR2DL5B *Immunogenetics*, 2002, 54 (5) 314 – 9

Gomez – Lozano N, Vilches C Genotyping of human killer – cell immunoglobulin – like receptor genes by polymerase chain reaction with sequence – specific primers an update *Tissue Antigens* 2002; 59 184 – 8

Guethlein, L A , Flodin, L R , Adams, E J & Parham, P NK cell receptors of the orangutan (*Pongo pygmaeus*) a pivotal ecies for tracking the co- evolution of killer cell Ig – like receptors with MHC – C *J Immunol*. 2002, 169: 220 – 229

Guethlein, L A , et al , The expanded cattle KIR genes are orthologous to the conserved single – copy KIR3DX1 gene of primates *Immunogenetics*, 2007, 59(6) 517 – 22

Hammond JA, Guethlein LA, Abi-Rached L, Moesta AK, Parham P Evolution and srvival of marine carnivores did not require a diversity of killer cell Ig-like receptors or Ly49 NK cell receptors *J Immunol* 2009, 182(6) 3618 - 27

Hershberger, K L , Shyam, R , Miura, A & Letvin, N L Diversity of the killer cell Ig-like receptors of rhesus monkeys *J Immunol* 2001, 166 4380 – 4390

Hiby SE, Walker JJ, O'shaughnessy KM, *et al* , Combinations of maternal KIR and fetal HLA- C genes influence the risk of preeclampsia and reproductive success J Exp Med 2004, 200 957 – 965

Holm S J, Sakuraba K, Malbris L, Wolk K, Stahle M, Sanchez FO Distinct HLA- C/ KIR genotype profile associates with guttate psoriasis J Invest Dermatol 2005, 125(4) 721- 730

Hsu K C, Liu XR, Selvakumar A, Mickelson E, O'Reilly RJ, Dupont B Killer Ig – like receptor haplotype analysis by gene content evidence for genomic diversity with a minimum of six basic framework haplotypes, each with multiple subsets. J Immunol 2002, 169 5118-29

Jamieson A, Isnard P, Dorfman J, Coles M and Raulet D Turnover and Proliferation of NK Cells in Steady State and Lymphopenic Conditions The Journal of Immunology 2004, 172 864 - 870

Jiang K, Zhu FM, Lv QF, Yan LX Distribution of killer cell immunoglobulin-like receptors genes in the Chinese Han population Tissue antigens 2005, 65 556 - 563

Khakoo SI, Rajalingam R, Shum BP, Weidenbach K, Flodin L. Rapid evolution of NK cell receptor systems demonstrated by comparison of chimpanzees and humans Immunity 2000, 12 687 – 698

Khakoo SI, Thio CL, Martin MP, *et al* HLA and NK cell inhibitory receptor genes in resolving hepatitis C virus infection Science 2004, 31 429 – 434

Khakoo SI, Carrington M KIR and disease a model system or system of models? Immunological Reviews 2006 ;214 186 – 201

Kitayama J, Juji T, Atomi Y, Kuroda A, Muto T, Kobayashi M, Mitsui Y and Minami M Transendothelial migration activity of lymphokine-activated killer(LAK) cells The Journal of Immunology.1993,151 1663 - 1672

Ljunggren H, Karre K In search of the "missing self"- MHC molecules and NK cell recognition Immunology Today 1990, 11 237 - 244

Loetscher P, Sätzl M, Clark-Lewis I, Baggiolini M and Moser B. Activation of NK cells by CC chemokines. Chemotaxis, Ca²⁺ mobilization, and enzyme release 1996,156 322 - 327

Long EO, Colonna M, Lanier LL Inhibitory MHC Class I receptor on NK and T cells a standard nomenclature Immunol Today 1996, 17 100

Luszczek W, Mańczak M, Cisz'o M *et al*, Gene for the activating natural killer cell receptor, KIR2DS1, is associated with susceptibility to psoriasis vulgaris *Hum Immunol* 2004, 65 758 – 766

Marsh SGE, Parham P, Barber LD The organization of HLA genes with the HLA complex In Marsh SGE, Parham P, Barber LD, editors *The HLA Facts Book* London, Academic Press, 2000

Martin AM, Freitas EM, Witt CS, Christiansen F The genomic organization and evolution of the Natural Killer immunoglobulin – like receptor (KIR) gene Cluster *Immunogenetic* 2000, 51(4- 5) 268-80

Martin MP, Gao X, Lee JH, *et al* Epistatic interaction between KIR3DS1 and HLA- B delays the progression to AIDS *Nat Gent* 2002, 31 429 – 434

McQueen KL, Donghi KM, Guethlein LA, Wong R, Sanjanwala B, Parham P Donor – recipient combinations of group A and B KIR Haplotypes and HLA class I ligand affect the outcome of HLA – matched, sibling donor hematopoietic cell transplantation. *Hum Immunol* 2007, 68 309 – 323

Middleton D, Williams F, Halfpenny IA KIR genes *Transpl Immun* 2005 14 135 – 42

Middleton D, Halfpenny IA, Meenagh A, Williams F, Sivula J, Tuomilehto-Wolf E Investigation of KIR gene frequencies in type 1 diabetes mellitus *Hum Immunol* 2006, 67(12) 986 – 990

Moesta AK, Norman PJ, Yawata M, Yawata N, Gleimer M Synergistic polymorphism at two positions distal to the ligand- binding site makes KIR2DL2 a stronger receptor for HLA- C than KIR2DL3 *J Immunol* 2008, 180 (6) 3969 – 79

Namekawa T, Snyder MR, Yen JH, Goehring BE, Leibson PJ, Weyand CM Killer cell activating receptors function as costimulatory molecules on CD4+CD28 null T cells clonally expanded in rheumatoid arthritis *J Immunol* 2000, 165(2) 1138 – 1145.

Naumova E, Mihaylova A, Stoitchkov K, Ivanova M, Quin L, Toneva M Genetic polymorphism of NK receptors and their ligands in melanoma patients prevalence of inhibitory over activating signals. *Cancer Immunol Immunother* 2005, 54 172 – 178

Nelson GW, Martin MP, Gladman D, Wade J, Trowsdale J, Carrington M Cutting edge heterozygote advantage in autoimmune disease hierarchy of protection/ susceptibility conferred by HLA and Killer Ig – like receptor combinations in psoriatic arthritis *J Immunol* 2004, 173 4273 – 4276

Niokou D, Spyropoulou-Vlachou M, Darlamitsou A, Stavropoulos-Giokas C Distribution of Killer Cell Immunoglobulin-like Receptors in the Greek Population *Hum Immunology* 2003, 64 1167-1176

Norman PJ, Carrington C, Byng M, Maxwell L, Curran d, Stephens F, Chandanayingyoung D, Verity D, Hammed K, Ramdath D and Vaughan RW. Natural killer cell immunoglobulin – like receptor (KIR) locus profiles in African and South Asian populations *Genes and Immunity* 2002, 3 86– 95

Norman PJ, Cook MA, Carey BS et al SNP haplotypes and allele frequencies show evidence for disruptive and balancing selection in the human leukocyte receptor complex *Immunogenetics* 2004, 56 225 – 37

Norman PJ, Abi-Rached L, Gendzekhadze K, Hammond J, Moesta A, Sharma D, Graef T, McQueen K, Guethlein L, Carrington C, Chandanayingyong D, Chang Y, Crespi C, Saruhan-Direskeneli G, Hammed K, Kamkamidze G, Koram K, Layrisse Z, Matamoros N, Mila J, Hee Park M, Pitchappan R, Dan Ramdath D, Shiao M, Stephens H, Struik S, Tian D, Verity D, Vaughan R, Davis R, Fraser P, Riley E, Ronaghi M and Parham P Meiotic recombination generates rich diversity in NK cell receptor genes, alleles, and haplotypes *Genome Res* 2009, 19 757 - 769

Ordóñez D, Meenagh A, Gomez- Lozano, Castaño J, Middleton D, Vilches C Duplication, Mutation and recombination of the human orphan gene KIR2DS3 contribute to the diversity of KIR haplotypes *Genes Immun* 2008, 9 431-7

Parham P MHC class I molecules and KIR in human history, health and survival *Nature Reviews Immunology* 2005, 5 201 – 214

Petersdorf Ew Risk assessment in haematopoietic stem cell transplantation histocompatibility *Best Pract Res Clin Haematol* 2007, 20 155 – 70.

Piccioli D, Sbrana S, Melandri E and Valiente N Contact-dependent Stimulation and Inhibition of Dendritic Cells by Natural Killer Cells *J Exp Med* 2002, 195 335 - 341

Pobezinskii L, Pobezinskaya e, Zvezdova E, Petrishchev V, Grinenko T, Baturina I, Anfalova T, Khromykh L, Vasileva T and Kazanskii D. Accumulation of Neutrophils in spleen of mice immunized with cells of allogenic tumors 2005, 402 1- 6

Rajagopalan S, Long EO Understanding how combinations of HLA and KIR genes influence disease *J Exp Med* 2005, 201 1025 – 1029

Rajalingam R, Du Z, Meenagh et al Distinct diversity of KIR genes in the three southern Indian populations comparison with world populations revealed a link between KIR gene content and pre- historic human migrations *Immunogenetics* 2008, 60 207-17

Rajalingam R Overview of the Killer cell immunoglobulin – like receptor system
Methods Mol Biol 2012, volumen 882 pp391- 414 Doi 10 1007/ 978 - -61779 -842-9_23

Sambrook, J G , Bashirova, A , Palmer, S., Sims, S , Trowsdale, J , Abi – Rached, L , Parham, P , Carrington, M & Beck, S Single haplotype analysis demonstrates rapid evolution of the killer immunoglobulin – like receptor (KIR) loci in primates *Genome Res* 2005, 15,25 -35

Santaourlidis S, Trompeter H-I, Weinhold S, Eisermann B, Meyer KL, Wernet P, Uhrberg M Crucial role of DNA methylation in determination of clonally distributed Killer cell Ig- like receptor expression patterns in NK cells *J Immunol* 2002, 169 4253- 4261

Scalzo AA Succesful control of viruses by NK cells-- a balance of opposing forces? *Trends Microbiol* 2002, 10 470 - 474

Shilling HG, Guethlein LA, Cheng NW, et al Allelic polymorphism synergizes with variable gene content to individualize human KIR genotype. *J Immunol* 2002; 168 2307 – 15

Single RM, Martin MP, Gao X, Meyer D, Yeager M, Kidd JR, Kidd KK, Carrington M Global diversity and evidence for coevolution of KIR and HLA *Nat Genet.* 2007, 39 1114- 1119

Suzuki Y, Hamamoto Y, Ogasawara Y, Ishikawa K, Yoshikawa Y, Sasazuki T et al Genetic polymorphism of Killer Cell immunoglobulin- like receptors are associated with susceptibility to psoriasis vulgaris *J invest Dermatol* 2004,122(5) 1133- 1136

Tokar M, Norgate Z, Colonna M, Trowsdale J and Wilson M Isotypic variation of novel immunoglobulin- like transcript / killer cell inhibitory receptor loci in the leukocyte receptor complex *Eur J Immunol* 1998, 28(12) p3959- 67

Toneva M, Lepage V, Lafay G, Dulphy N, Busson M, Lester S, Vutrien N, Michaylova A, Naumova E, McCluskey J and Charron D Genomic diversity of natural killer cell receptor genes in three populations. *Tissue antigens* 2001, 57 358 – 362

Trinchieri G Biology of Natural Killer Cells *Advances in Immunology* 1989, 47 187 - 376

Trowsdale J Genetic and functional relationships between MHC and NK receptor genes 2001, 15 363 - 374

Uhrberg M, Valiente NM, Shum BP, Shilling H G, Lienert – Weidenbach K, Corlis B, Tyau D, Lanier LL, Parham P Human diversity in Killer cell inhibitory receptor genes *Immunity* 1997, 7 753 – 763

Uhrberg M, Parham P, Wernet, P Definition of gene content for nine common group B haplotypes of the caucasoid population KIR haplotypes contain between seven and eleven KIR genes *Immunogenetics* 2002, 54 221 – 9

Van der Slik AR, Koelman BP, Verduijn W, Bruining GJ, Roep BO, Giphart MJ KIR in type 1 diabetes disparate distribution of activating and inhibitory natural killer cell receptors in patients versus HLA – matched control subjects *Diabetes* 2003, 52(10) 2639 – 2642

Vilches C, Rajalingam R, Uhrberg M, Gardiner CM, Young NT, Parham P KIR2DL5, a novel Killer – cell receptor with a D0 - D2 configuration of Ig – like domains *J Immunol* 2000a, 164 (11) 5797 – 804

Vilches C, Gardiner C, and Parham P Gene structure and promotor variation of expressed and nonexpressed variants of KIR2DL5 *J Immunol*, 2000b, 165(11) 6416- 21

Vilches C, Parham P KIR: diverse rapidly evolving receptors of innate and adaptative immunity *Annu Rev Immunol* 2002, 20 217- 251

Vilches C, Castano J, Gomez – Lozano N, Estefania E Facilitation of KIR genotyping by a PCR – SSP method that amplifies short DNA fragments *Tissue Antigens* 2007, 70 415 – 22

Wang DH, Park H, Yoon JA, Park MH Haplotype analysis of killer cell immunoglobuline-like receptor genes in 77 Korean families *Human Immunology* 2005, 66 146 – 154

Welch, A Y, Kasahara, M & Spain, L M Identification of the mouse killer immunoglobulin – like receptor – like (KIRL) gene family mapping to chromosome X *Immunogenetics* 2003, 54 782 – 790

Williams AP, Bateman AR, Khakoo SI Hanging in the balance KIR and their role in disease *Mol Interv* 2005, 5 226 – 240

Wilson, M.J, Torkar, M, Haude, A, Milne, S., Jones, T, Sheer, D, Beck, S and Trowsdale, J, Plasticity in the organization and sequences of human KIR/ ILT gene families *Proc Natl Acad Sci USA* 2000, 97(9) 4778 – 83

Yawata M, Yawata N, McQuenn KL, Cheng NW, Guethlein LA, Rajalingam R, Shilling HG, Parham P Predominance of group A KIR haplotypes in Japanese associated with diverse NK cell repertoires of KIR expression *Immunogenetics* 2002, 54 543 – 550